

Analytik einiger therapeutisch angewandter
Dibenzazepinderivate und Metabolismus
des 5-Carbamoyl-5H-dibenzo [b, f] azepin
(INN: Carbamazepin; Tegretal®)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Otto Bredenstein

aus Schlochtern

Berlin 1972

Analytik einiger therapeutisch angewandter
Dibenzazepinderivate und Metabolismus
des 5-Carbamoyl-5H-dibenzo [b,f] azepin
(INN: Carbamazepin; Tegretal®)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Otto Bredenstein
aus Schlochtern
Berlin 1972

1. Referent

Professor Dr. G. Schenck

2. Referent

Professor Dr. K. -H. Frömming



Tag der mündlichen Prüfung 20. 3. 72

Tag der Promotion

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Hauptteil	4
A. Analytik der Dibenzazepinderivate	4
1. Beschreibung der untersuchten Substanzen	5
a. Carbamazepin	5
b. Clomipramin	6
c. Desipramin	7
d. Imipramin	8
e. Opipramol	9
f. Trimipramin	10
2. Spektren	13
3. Dünnschichtchromatographie	20
B. Isolierung eines Carbamazepin-Reaktions-24 produktes	
C. Analytik möglicher Harnausscheidungs-31 produkte des Carbamazepin	
1. Beschreibung der untersuchten Substanzen	32
a. Carbamazepin	32
b. Iminostilben	33
c. 9-Methylacridin	36
d. Acridin-9-carbaldehyd	36
e. Acridin	38
f. Acridon	39
2. Dünnschichtchromatographie	41
D. Metabolismus des Carbamazepin	42
1. Untersuchungsmaterial	42
2. Aufarbeitung	42
3. Dünnschichtchromatographische Unter-42 suchung der Extrakte	
4. Isolierung von Harnausscheidungs-45 produkten	

	Seite
5. Identifizierung der Substanzen Nr.VII bis XII und Vergleich mit den Modell- substanzen	45
a. Substanz Nr.VII	46
b. Substanz Nr.VIII	49
c. Substanz Nr.IX	53
d. Substanz Nr.X	55
e. Substanz Nr.XI	58
f. Substanz Nr.XII	62
III. Ergebnisse	63
IV. Experimentelle Angaben	65
V. Literaturverzeichnis	68

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Als erste Verbindung aus der Reihe der Dibenzazepine wurde 1958 das Imipramin in die Therapie der endogenen Depressionen eingeführt. KUHN (1) hat erstmals seine antidepressive Wirkung beschrieben, die nur beim Kranken eintritt. Seit 1958 sind ca. 5000 Veröffentlichungen erschienen, die sich mit Klinik, Pharmakologie, Biochemie, Wirkungsmechanismus und Metabolismus des Imipramin befassen. Desipramin, das Desmethylderivat des Imipramin, wurde von HERRMANN und PULVER (2) als Metabolit aufgefunden. Nach GILLETTE und Mitarb. (3) ist dieser Metabolit für die antidepressive Aktivität des Imipramin verantwortlich. Seit 1961 wird Desipramin in der Therapie eingesetzt. Die Reihe der antidepressiv oder thymoleptisch wirksamen Dibenzazepine wurde in den nächsten Jahren durch Trimipramin, Opipramol und Clomipramin ergänzt. Weiterhin gehört - chemisch betrachtet - das Carbamazepin, als psychotropes Antiepileptikum (4,5), das auch gegen genuine Trigeminusneuralgie wirksam ist (6,7), in diese Gruppe.

Mit der wachsenden therapeutischen Bedeutung der Dibenzazepine mußten diese stark wirksamen Medikamente auch den Toxikologen zunehmend interessieren. Angeregt durch suizidale und akzidentelle Vergiftungsfälle sind qualitative - insbesondere dünnschichtchromatographische - Bestimmungen durchgeführt worden (8,9,10,11,12). Weitere analytische Daten wurden erhalten im Rahmen von Stoffwechseluntersuchungen (2,13,14,15,16,17,18). In allen vorstehend bezeichneten Arbeiten werden jeweils nur ein Dibenzazepinderivat und eventuell einige Metaboliten beschrieben.

KLINGE und BEYER (19) geben ein Verfahren an zur Identifizierung von Imipramin, Desipramin und Trimipramin durch Dünnschichtchromatographie mit dem Fließmittel Methanol/Ammoniak (25%) 100:1 und Besprühen mit Natriumnitritlösung.

Eine dünnschichtchromatographische Trennung von fünf Thymo-leptika beschreiben VIALA und Mitarb.(20). Sie wiesen auf der DC-Platte noch 100 ng der Substanzen durch Fluoreszenz nach, die nach Besprühen mit verdünntem Jodplatin-Reagenz und anschließend mit verdünnter Schwefelsäure allerdings erst nach 24 Stunden auftrat. WEIST und SCHMID (21) beschreiben einen dünnschichtchromatographischen Schnellnachweis von u.a. vier Dibenzazepinen. Eine Trennung von Carbamazepin, Desipramin, Imipramin und Opipramol erreichten sie durch zweimalige Entwicklung mit Zwischentrocknung. Als Sprühreagenz wurde Cer(IV)sulfat-Schwefelsäure verwendet. In einer weiteren Arbeit geben die gleichen Autoren zusammen mit LAUFFER (22) dünnschichtchromatographische Trennungsmethoden für 60 psychotrope Pharmaka an. Die Trennung der fünf untersuchten Dibenzazepine gelang in einem Fließmittel.

Im Folgenden werden die sechs therapeutisch angewandten Dibenzazepinderivate durch chemische und physikalische Daten charakterisiert und ihre Absorption im UV- und IR-Bereich untersucht. Weiter wird eine Trennung auf der DC-Platte in verschiedenen Fließmitteln und eine Identifizierung mit Hilfe von Sprühreagenzien beschrieben.

Untersuchungen über den Metabolismus der Dibenzazepine beim Menschen liegen hauptsächlich vom Imipramin vor, dessen Verhalten im Körper als aufgeklärt gilt (23). Vom Carbamazepin dagegen, das 1963 in die Therapie eingeführt wurde, ist noch kein Metabolit identifiziert worden. Es sind Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit der Pharmakologie (24) und der Toxikologie (25) dieser Verbindung befassen. FÜHR (17) hat 1964 den Carbamazepingehalt im Blut und Urin bestimmt. Er konnte bei einer Tagesdosis von 1200 - 1800 mg nur sehr geringe Mengen unveränderte Substanz nachweisen. Eine dünnschichtchromatographische Nachweismethode und eine fluoreszenzspektrophotometrische Bestimmung werden von SCHEIFFARTH und Mitarb.beschrieben (15). Die Autoren fanden im Liquor zwei Metaboliten, deren Rf-Wert und Farbe im UV-

Licht nach Besprühen mit Perchlorsäure angegeben wird. BRAUNHOFER und ZICHA (26) erwähnen das Auftreten von sieben nicht näher beschriebenen Metaboliten im Harn. In einer Untersuchung von WEIST und ZICHA (16) wird die Carbamazepin-Konzentration im Liquor ermittelt. Weiterhin konnten im Harnextrakt neben unverändertem Carbamazepin sieben Metaboliten abgegrenzt werden. Rf-Werte und Farbe nach Besprühen sind angegeben; einer der Metaboliten verhält sich chromatographisch und spektralphotometrisch wie Iminostilben.

Eine spektrophotometrische Bestimmungsmethode des Carbamazepin in toxikologischem Material beschreiben BEYER und KLINGE (12). Danach wird die wässerige, den Wirkstoff enthaltende Lösung eine Stunde mit 25 %iger Salzsäure erhitzt. Nach dem Erkalten wird die saure Lösung auf pH 9 - 10 eingestellt, mit Äther extrahiert und mit 2n Salzsäure reextrahiert. Die Extinktion dieser salzsauren Lösung wird im Maximum bei 255 nm gemessen. Da Carbamazepin ein Absorptionsmaximum bei 284 nm aufweist, muß sich das Molekül - wahrscheinlich während des Erhitzens mit Salzsäure - verändert haben.

Es war meine Aufgabe, das Reaktionsprodukt zu isolieren und zu identifizieren. Weiter war die Frage zu beantworten, in welcher Form Carbamazepin im Harn ausgeschieden wird. Es sollte ermittelt werden, wieviele Metaboliten sich nachweisen lassen und versucht werden, einige davon zu isolieren und zu identifizieren.

II. HAUPTTEIL

A. Analytik der Dibenzazepinderivate

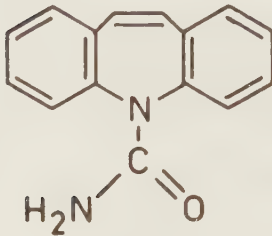
Im Folgenden sind einige analytische Daten der Dibenzazepine in Form von Monographien zusammengestellt und Literaturstellen über Synthese, Pharmakokinetik und Metabolismus angegeben. Als Beispiel wird die Metabolisierung des Imipramin beschrieben. Zur weiteren Charakterisierung wurden die UV- und IR-Spektren der Substanzen aufgenommen.

Im dritten Abschnitt werden Möglichkeiten zur dünnschichtchromatographischen Trennung der sechs Dibenzazepine in fünf Fließmittelsystemen angegeben und die Reaktionen mit drei Sprühreagenzien beschrieben.

1. Beschreibung der untersuchten Substanzen

a. Carbamazepin (INN)

Handelsname: Tegretal®



5-Carbamoyl-5H-dibenzo [b,f] azepin

Summenformel: $C_{15}H_{12}N_2O$

Molekulargewicht: 236,28

Aussehen: weiße Kristalle

Schmelzbereich: 190 - 193°C (24)

204 - 206°C (27)

189 - 193°C (28)

Löslichkeit: Äther :schwer löslich

Alkohol :löslich

Chloroform :löslich

Wasser :fast unlöslich

Synthese: (27)

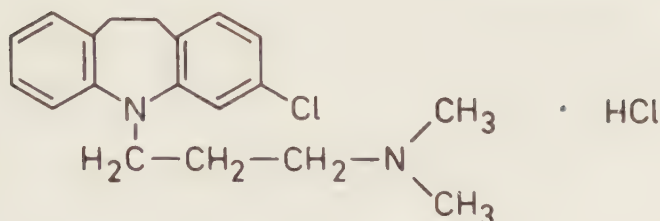
Anwendung: Antiepileptikum

Pharmakokinetik: (15,16)

Metabolismus: (15,16,26)

b. Clomipramin (INN)

Handelsname: Anafranil®



3-Chlor-5(3-dimethylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenzo [b,f] azepin-hydrochlorid

Summenformel: $C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$

Molekulargewicht: 351,32

Aussehen: weiße Kristalle

Schmelzbereich: 191 - 194°C (29)

191 - 192°C (30)

189 - 190°C (31)

Löslichkeit: Äther :fast unlöslich

Alkohol :löslich

Chloroform :sehr schwer löslich

Wasser :leicht löslich

Synthese: (30,31)

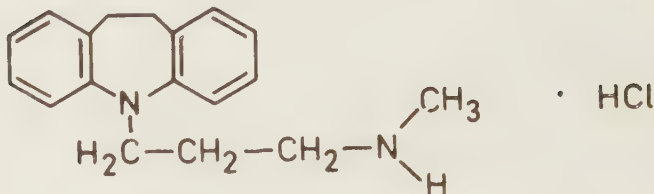
Anwendung: Thymoleptikum

Pharmakokinetik: (32)

Metabolismus: (32)

c. Desipramin (INN)

Handelsname: Pertofran®



5-(3-Methylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenzo
[b,f] azepin-hydrochlorid

Summenformel: $C_{18}H_{22}N_2 \cdot HCl$

Molekulargewicht: 302,85

Aussehen: weiße Kristalle

Schmelzbereich: 206 - 208°C (33)

214°C (34)

214 - 218°C (35)

Löslichkeit: Äther :fast unlöslich

Alkohol: :löslich

Chloroform :leicht löslich

Wasser :löslich

Synthese: (33,35)

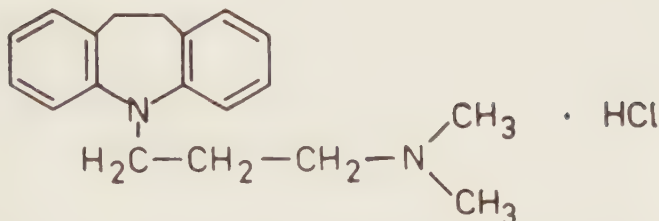
Anwendung: Thymoleptikum

Pharmakokinetik: (8,36)

Metabolismus: (8,37)

d. Imipramin (INN)

Handelsname: Tofranil®



5-(3-Dimethylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenzo
[b,f] azepin-hydrochlorid

Summenformel: $C_{19}H_{24}N_2 \cdot HCl$

Molekulargewicht: 316,88

Aussehen: weißes, kristallines Pulver

Schmelzbereich: 174 - 175°C (38)

170 - 174°C (39)

Löslichkeit: Äther :fast unlöslich

Alkohol :leicht löslich

Chloroform :löslich

Wasser :leicht löslich

Synthese: (38)

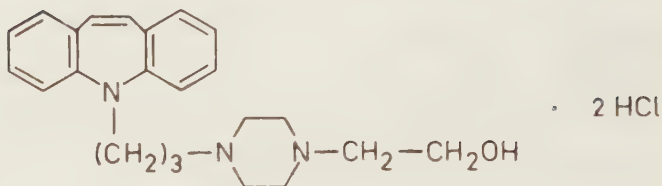
Anwendung: Thymoleptikum

Pharmakokinetik: (23,11,40,41,42)

Metabolismus: (3,2,10,14,32,37,40,43,44,45)

e. Pipramol (INN)

Handelsname: Insidon®



5- [3-(2-Hydroxyethylpiperazino)-propyl] -5H-dibenzo
[b,f] azepin-dihydrochlorid

Summenformel: $C_{23}H_{29}N_3O \cdot 2HCl$

Molekulargewicht: 436,43

Aussehen: gelbes kristallines Pulver

Schmelzbereich: 228 - 230°C (46)

210°C (47)

Löslichkeit: Äther	: fast unlöslich
Alkohol	: schwer löslich
Chloroform	: sehr schwer löslich
Wasser	: sehr leicht löslich

Synthese: (46,47)

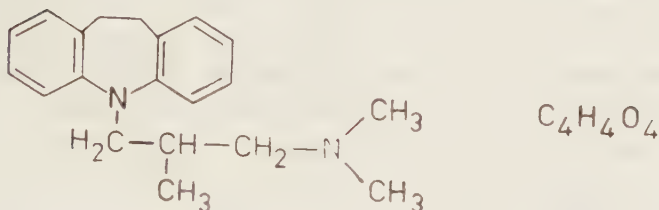
Anwendung: Thymoleptikum

Pharmakokinetik: (13)

Metabolismus: (9,13)

f. Trimipramin (INN)

Handelsname: Stangyl®, Surmontil®



5-(3-Dimethylamino-2-methyl-propyl)-10,11-dihydro-5H-dibenzo [b,f] azepin-maleat

Summenformel: $C_{20}H_{26}N_2 \cdot C_4H_4O_4$

Molekulargewicht: 410,51

Aussehen: weiße Kristalle

Schmelzbereich: 142°C (48)

141- 145°C (49)

Löslichkeit: Äther :fast unlöslich

Alkohol: :wenig löslich

Chloroform :leicht löslich

Wasser :schwer löslich

Synthese: (48)

Anwendung: Thymoleptikum

Pharmakokinetik: -

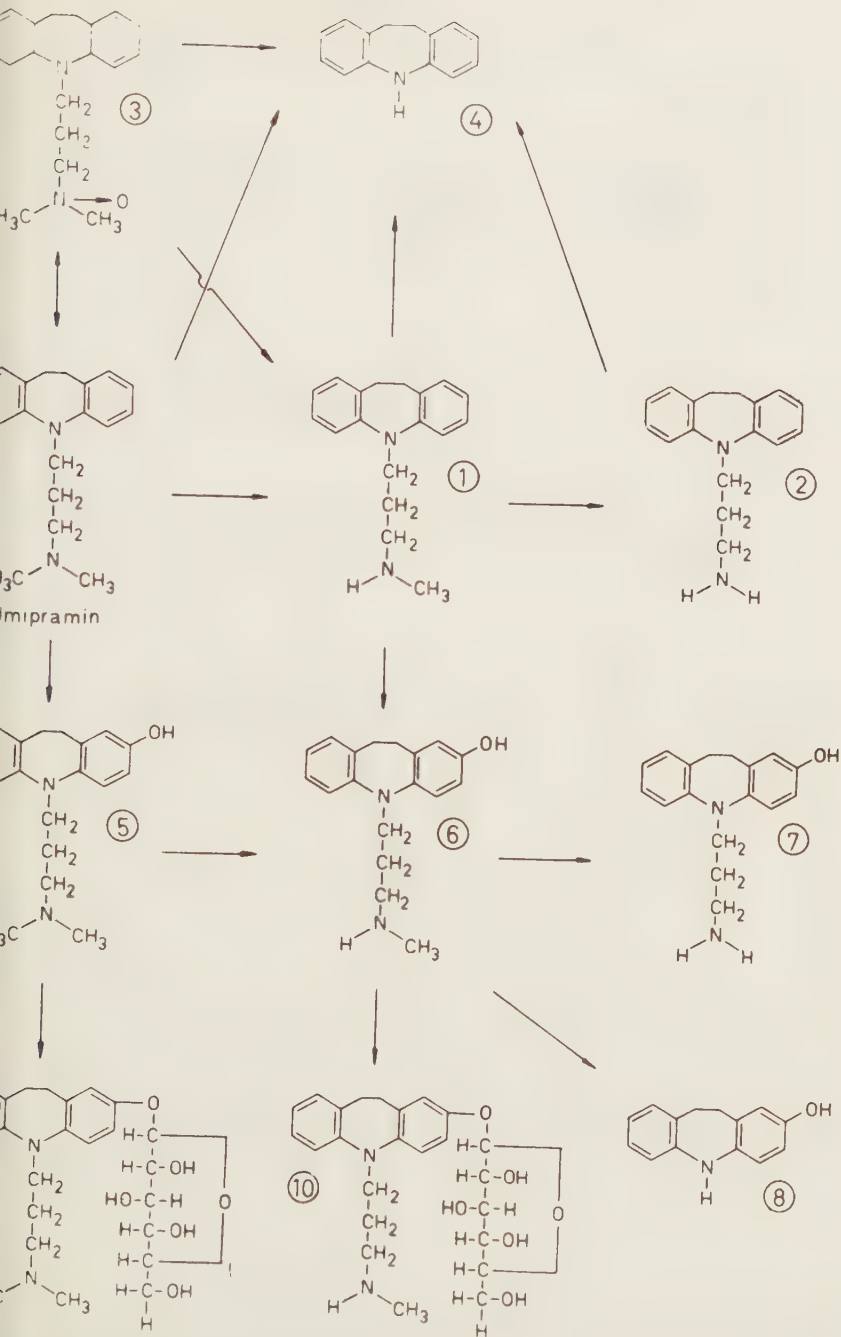
Metabolismus: -

Imipramin ist das einzige Thymoleptikum aus der Reihe der Dibenzazepinderivate, dessen Verhalten im menschlichen und tierischen Organismus heute als praktisch völlig aufgeklärt gilt. Mehr als 20 Metaboliten sind bekannt, und es ist nicht zu erwarten, daß in vivo weitere in nennenswerten Mengen gebildet werden (8). Die Hauptmetaboliten, die z.B. im Organismus der Ratte auftreten können (23), sind folgende:

- 1.) Desmethylimipramin
- 2.) Desdimethylimipramin
- 3.) Imipramin-N-Oxid
- 4.) Iminodibenzyl
- 5.) 2-OH-Imipramin
- 6.) 2-OH-Desmethylimipramin
- 7.) 2-OH-Desdimethylimipramin
- 8.) 2-OH-Iminodibenzyl
- 9.) 2-OH-Imipraminglucuronid
- 10.) 2-OH-Desmethylimipraminglucuronid

Eine exakte Einteilung in primäre, sekundäre und tertiäre Metaboliten ist beim Imipramin nicht möglich. Es konnten 16 verschiedene Metabolisierungsschritte aufgefunden werden (44).

Eine Übersicht über die Hauptstoffwechselprodukte des Imipramin und über Möglichkeiten ihrer Entstehung ist auf Seite 12 gegeben.



2. Spektren

UV-Spektren

Die UV-Absorption der Dibenzazepine wurde in drei verschiedenen Lösungsmitteln gemessen:

1. Methanol
2. 0,1 n Natronlauge
3. 0,1 n Salzsäure

Abb.1: UV-Spektrum von Carbamazepin

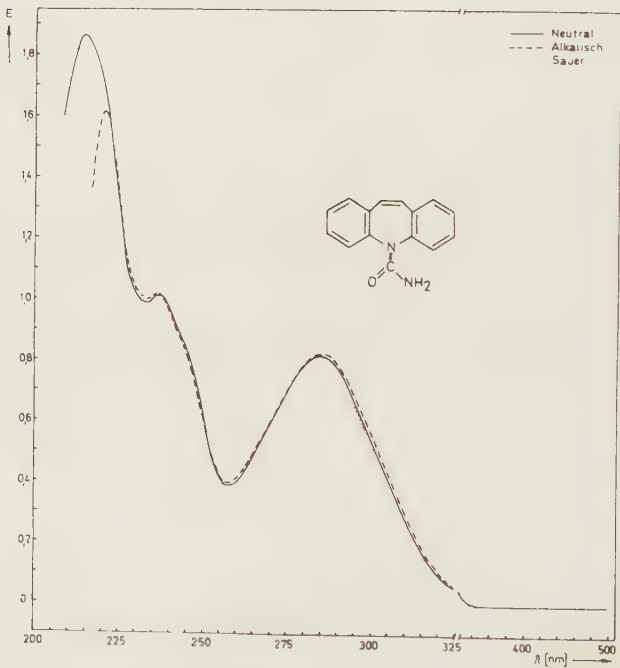


Abb.2: UV-Spektrum von Clomipramin

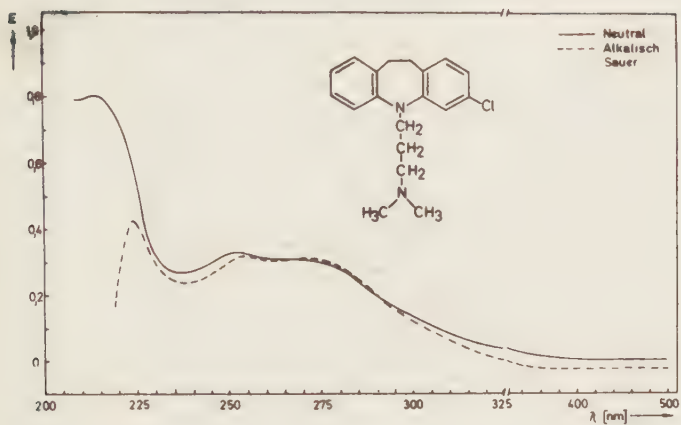


Abb.3: UV-Spektrum von Desipramin

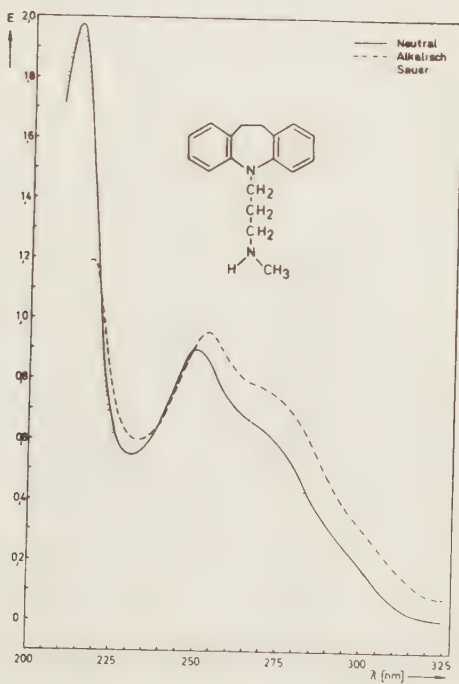


Abb.4: UV-Spektrum von Imipramin

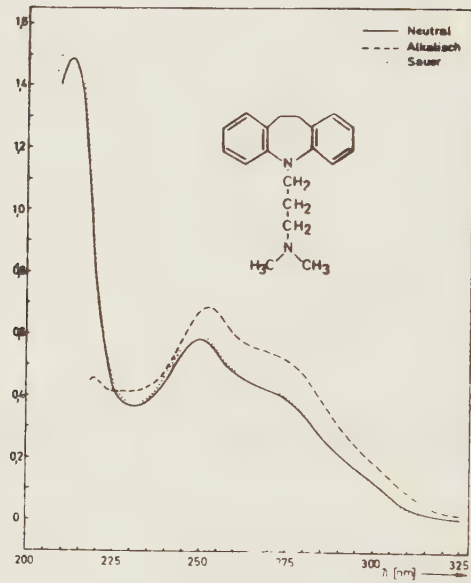


Abb.5: UV-Spektrum von Opipramol

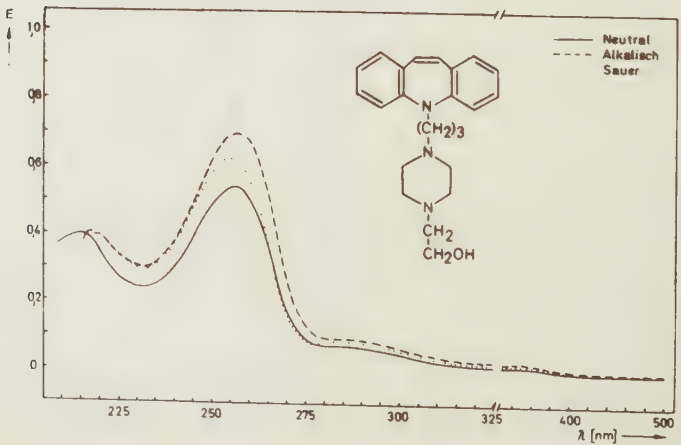
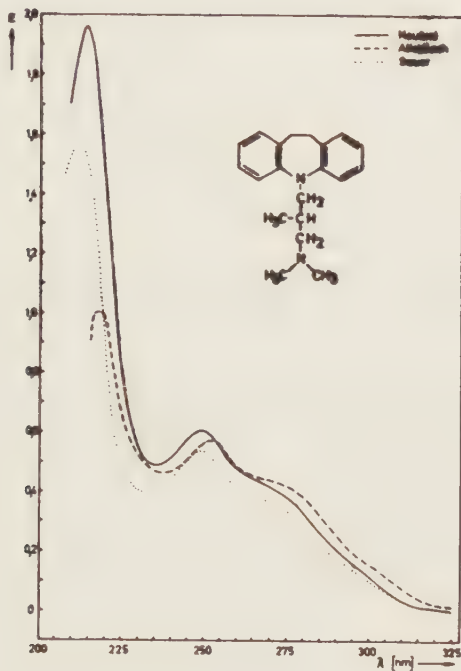


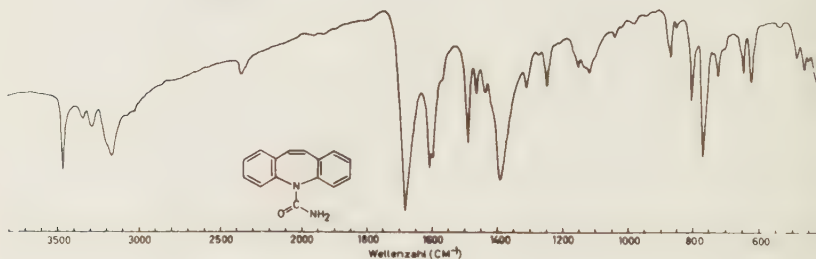
Abb.6: UV-Spektrum von Trimipramin



IR-Spektren (50)

Da im Rahmen von toxikologischen Untersuchungen die in Frage kommenden Substanzen in der Regel als Basen mit organischen Lösungsmitteln aus alkalisiertem wässrigen Material extrahiert werden, erschien es sinnvoll, hier die IR-Absorption der Basen zu messen (Lösungsmittel: Chloroform). Das IR-Spektrum des Carbamazepin wurde in KBr aufgenommen.

Abb.7: IR-Spektrum von Carbamazepin in KBr



Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

770: CH - out of plane - Deformation

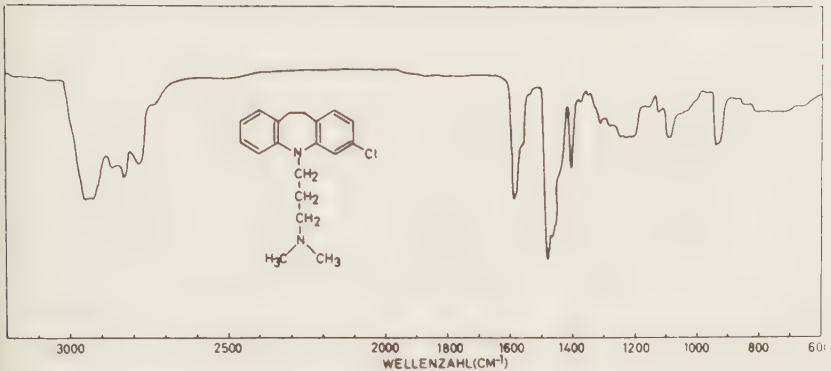
1390: NH - Deformation

1490, 1600, 1609: CC - Valenz - Aromat

1683: CO - Valenz

3020, 3170, 3290, 3350, 3470: NH- und CH - Valenz

Abb.8: IR-Spektrum von Clomipramin - Base in CHCl_3 :

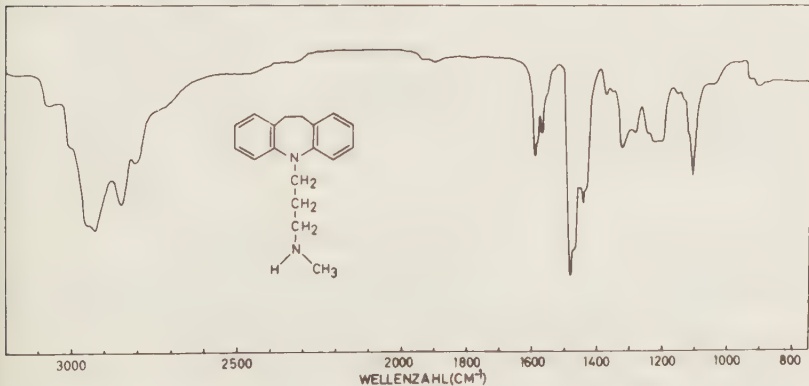


Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

1480, 1590: CC - Valenz - Aromat

2780, 2830, 2870, 2920-2950: CH - Valenz

Abb.9: IR-Spektrum von Desipramin-Base in CHCl_3 :

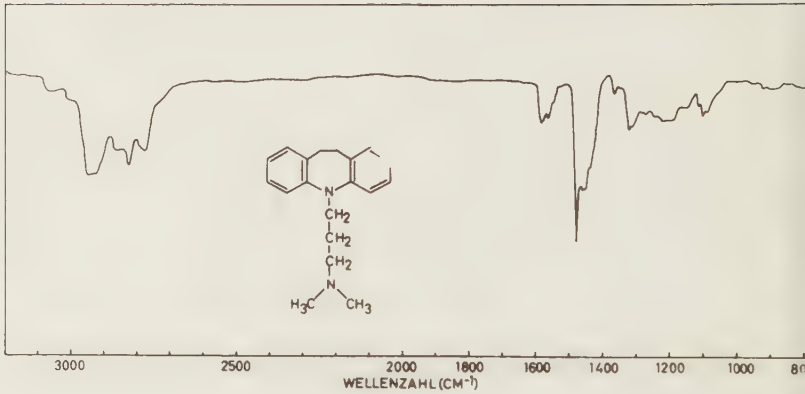


Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

1485, 1570, 1595: CC - Valenz - Aromat

2800, 2850, 2930, 2950, 3010, 3075: CH - Valenz

Abb.10: IR-Spektrum von Imipramin-Base in CHCl_3 :

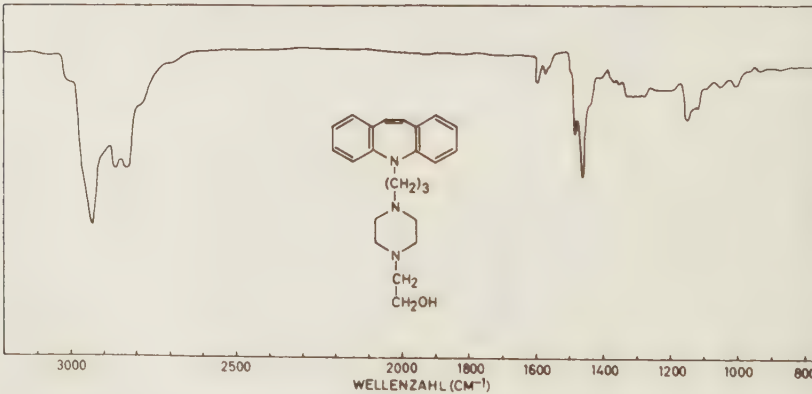


Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

1480, 1565, 1590: CC - Valenz - Aromat

2780, 2830, 2920-2950, 3010, 3070: CH - Valenz

Abb.11: IR-Spektrum von Opipramol-Base in CHCl_3 :

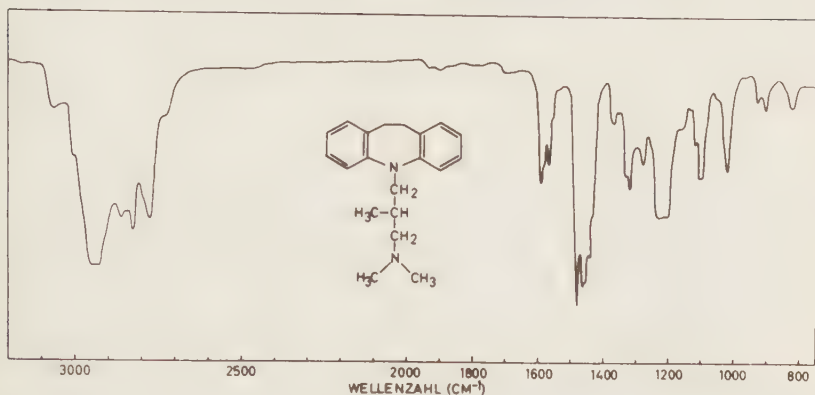


Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

1485, 1575, 1595: CC - Valenz - Aromat

2830, 2865, 2930, 3010, 3070: CH - Valenz

Abb.12: IR-Spektrum von Trimipramin-Base in CHCl_3 :



Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

1480, 1570, 1590: CC - Valenz - Aromat

2780, 2830, 2870, 2930-2960: CH- Valenz

3. Dünnschichtchromatographie

Zur dünnenschichtchromatographischen Auftrennung der Dibenzazepine wurden selbstgestrichene Platten verwendet. Die Sorptionsschicht bestand aus Kieselgel GF₂₅₄ 0,25 mm dick. Folgende Fließmittel erwiesen sich bei Kammer-sättigung als geeignet:

Fließmittel:

- | | |
|---|---------|
| a) Methanol/Ammoniak (25%) | 100:1 |
| b) Benzol/Aceton/Ammoniak (25%) | 50:10:1 |
| c) Chloroform/n-Propanol/Ammoniak (25%) | 50:50:1 |
| d) Chloroform/n-Butanol/Ammoniak (25%) | 50:50:1 |
| e) Chloroform/Methanol | 9:1 |

Tab.1: hRf-Werte der Dibenzazepine auf Kieselgel GF₂₅₄
in den Fließmittelsystemen a.-e.

Fließmittel	a.	b.	c.	d.	e.
Carbamazepin	68	14	73	79	68
Clomipramin	46	57	69	53	51
Desipramin	20	18	29	19	22
Imipramin	41	51	55	47	43
Opipramol	53	11	38	21	40
Trimipramin	57	71	72	70	59

Tab.2: Detektion der Dibenzazepine auf der DC-Platte

Carbamazepin	Clomipramin	Desipramin	Imipramin	Opipramol	Trimipramin
-	-	-	-	-	-
Fluoresz. löschung o,5	Fluoresz. löschung o,4	Fluoresz. löschung o,2	Fluoresz. löschung o,2	Fluoresz. löschung o,2	Fluoresz. löschung o,2
-	-	-	-	gelbbraun o,2	-
gelbgrün 2	tiefblau o,1	tiefblau o,1	tiefblau o,05	gelb o,2	tiefblau o,1
blaugrün o,1	-	-	-	grüngelb o,05	-
gelbgrün o,05	-	-	-	grüngelb o,02	-
orange 10	orange 1	orange 2	orange o,5	orange 2	orange 2
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
graubraun 10	braun o,5	braun o,5	braun o,4	graubraun o,2	braun 1
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

Farbe der Substanzen:1.) ohne Sprühreagenz

- 2.) nach Besprühen mit $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ -Reagenz (52)
- 3.) nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz (51)
- 4.) nach Besprühen mit Jodplateat-Reagenz,
anschließend mit Schwefelsäure(50%ig) (52,20)
jeweils a.Betrachtung im Tageslicht
b.Betrachtung im UV-Licht bei 254 nm
c.Betrachtung im UV-Licht bei 360 nm

Die in der Tabelle angegebenen Zahlen bezeichnen die Nachweisgrenze der betreffenden Substanzen in μg .

Außer mit den obengenannten Sprühreagenzien wurde noch mit

Kaliumpermanganat- und Kaliumdichromatlösung besprüht. Die Färbungen waren ähnlich wie nach dem Besprühen mit Cer(IV)sulfat-Reagenz, jedoch weniger intensiv.

Die Unterscheidung von Clomipramin, Imipramin und Trimipramin mit Hilfe von Sprühreagenzien war nicht möglich, gelang aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in Fließmittel e. Wesentlich bessere Trennmöglichkeiten ergaben sich für jeweils zwei von diesen Verbindungen, z.B. für Clomipramin und Imipramin in Fließmittel c., für Clomipramin und Trimipramin in Fließmittel d. und für Imipramin und Trimipramin in allen Fließmitteln. Desipramin, das mit den Sprühreagenzien wie die drei obengenannten Verbindungen reagiert, unterscheidet sich als sekundäres Amin deutlich durch seine R_f -Werte in allen Fließmitteln. Carbamazepin und Opipramol schließlich sind auf der DC-Platte nach Besprühen mit Cer(IV)sulfat-Reagenz beim Betrachten im kurz- und langwelligem UV-Licht schon in sehr geringen Mengen zu identifizieren.

B. Isolierung und Identifizierung eines Carbamazepin-Reaktionsproduktes

In einer ersten Mitteilung von BEYER und KLINGE (12) war ein spektrophotometrisches Verfahren zum Nachweis von Carbamazepin beschrieben worden, das auf folgendem Prinzip beruht: Carbamazepin wird durch Kochen mit Salzsäure am Rückflußkühler in eine neue Verbindung überführt, die aus alkalischem Milieu mit Äther extrahiert wird. Die Ätherphase wird sodann mit 2n HCl reextrahiert. Diese salzsaure Lösung stellt die Meßlösung dar. Durch die sehr hohe spezifische Extinktion des Reaktionsproduktes bot diese Methode auch gute Voraussetzungen, um Carbamazepin in biologischem Material bestimmen zu können, wie in einer weiteren Mitteilung (53) gezeigt werden konnte.

Um das unbekannte Reaktionsprodukt zu isolieren und zu identifizieren, wurde Carbamazepin eine Stunde in Salzsäure am Rückflußkühler gekocht, die Lösung alkalisch gemacht und mit Benzol extrahiert. Das Benzol wurde abgedampft, der Rückstand in wenig Methanol gelöst, durch Verdünnen mit Wasser wieder ausgefällt, abfiltriert, gewaschen und getrocknet.

Eigenschaften

Aussehen :gelbe Kristallnadeln

Löslichkeit :leicht löslich in Alkohol, Äther,
Chloroform, Benzol und Säuren,
fast unlöslich in Wasser und Laugen

Schmelzbereich: 112 - 118°C

Elementaranalyse: C 86,1%; H 5,69%; N 7,14%;

die Elementaranalyse ergibt die Summenformel $C_{14}H_{11}N$
mit dem Molekulargewicht 193,25.

Dünnschichtchromatographie

Tab.3: hRf-Werte auf selbstgestrichenen Platten
Kieselgel GF₂₅₄

Fließmittel	hRf-Werte	
	Reaktionsprod.	Carbamazepin
Chloroform/Aceton/Ameisensäure 5 : 4 : 1	44	68
Chloroform/n-Propanol/NH ₃ (25%) 50 : 50 : 1	90	78
Chloroform/Cyclohexan/Diäthylamin 5 : 4 : 1	64	21

Fluoreszenz im UV-Licht

	a. in saurer	b. in alkal.Lösung
1. bei 254 nm:	gelbgrün	hellblau
2. bei 360 nm:	gelbgrün(stärker)	hellblau(stärker)

UV-Spektrum:	Lösungsmittel	Maximum λ [nm]
	CH ₃ OH	251, 337, 354
	0,1n NaOH	251. 337, 354
	0,1n HCl	256, 334, 350

Abb.13:UV-Spektrum des Carbamazepin-Reaktionsproduktes

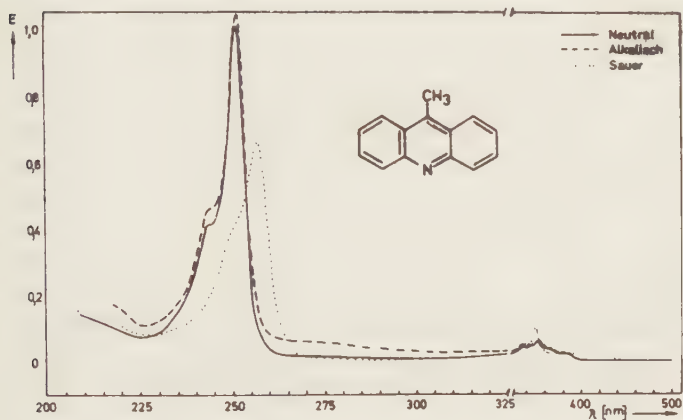
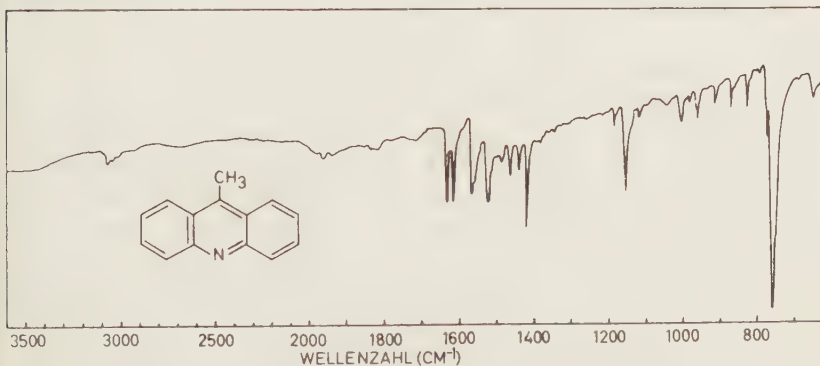


Abb.14:IR-Spektrum des Carbamazepin-Reaktionsproduktes in KBr



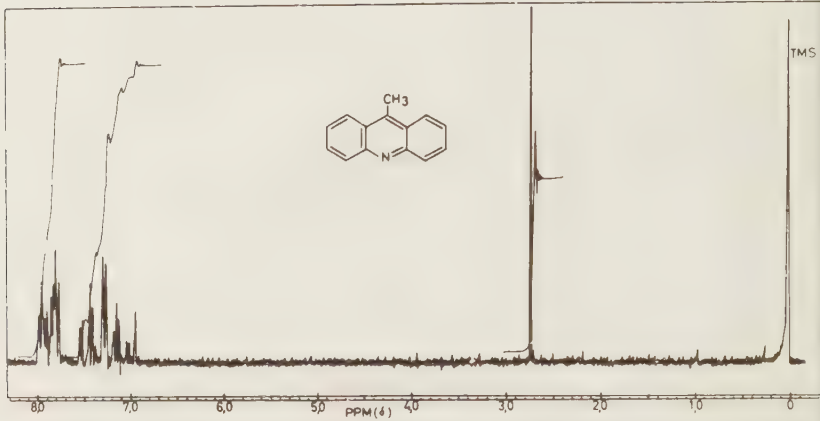
Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

760: CH - out of plane - Deformation

1520, 1570, 1620, 1635: CC- und CN- Valenz - Aromat

2900 - 3100: CH- Valenz

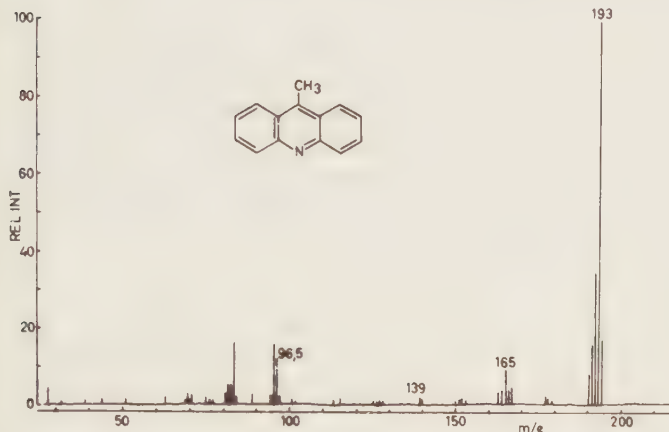
Abb.15: NMR-Spektrum des Carbamazepin-Reaktionsproduktes



Es werden zwei Multipletts ($\delta = 3,9-7,3$ ppm und $7,75-8,0$ ppm) und ein Singulett ($\delta = 2,73$ ppm) registriert. Die Intensitäten verhalten sich wie 4:4:3.

Massenspektrum: m/e	: 32	82,5	83,5	95,5	96	96,5	135
I (%)	: 5	5	13	14	5	11	9
m/e	: 190	191	192	193	194		
I (%)	: 8	18	36	100	18		

Abb.16: Massenspektrum des Carbamazepin-Reaktionsproduktes

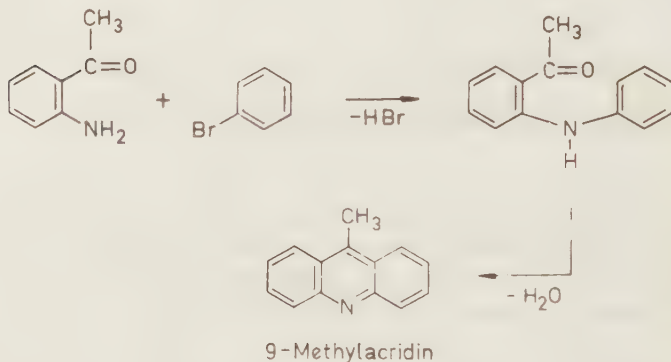


Der Molpeak erscheint bei m/e 193. Durch Abspaltung von H und HCN können Peaks bei m/e 192 und 165 erklärt werden. Die Peaks bei m/e 82,5 und 96,5 entstehen wahrscheinlich durch doppelt geladene Ionen (165^{++} und 193^{++}).

Die ermittelten physikalisch-chemischen Eigenschaften der isolierten Substanz ließen an eine Acridinverbindung, insbesondere an ein Methylacridin denken. So zeigt das in der Literatur (54) angegebene Spektrum des Acridins im UV-Licht weitgehend übereinstimmende Eigenschaften mit dem des Carbamazepinreaktionsproduktes. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Elementaranalyse (Summenformel $C_{14}H_9N$) und des Massenspektrums (Molpeak bei m/e 193) geht aus dem NMR-Spektrum hervor, daß es sich hier um das 9-Methylacridin handeln muß, da die drei Methylprotonen als Singulett erscheinen.

Synthese des 9-Methylacridins

Die Darstellung in der von SCHINDLER (55) beschriebenen Form - Ausgangssubstanz war bei ihm Acetylaminostilben - führte bei Carbamazepin als Ausgangssubstanz zu einer zu geringen Ausbeute. Deshalb wurde 9-Methylacridin nach einer von JENSEN und RETHWISH (56) angegebenen Methode synthetisiert. Danach wird 2-Aminoacetophenon mit Brombenzol zum 2-Acetyldiphenylamin umgesetzt, das in Gegenwart von Schwefelsäure und Eisessig unter Wasseraustritt und Ringschluß in das 9-Methylacridin übergeht.



Das 9-Methylacridin wurde aus dem alkalisierten Reaktionsansatz mit Benzol extrahiert und weiter, wie eingangs im Abschnitt B. beschrieben, aufgearbeitet.

Ein Vergleich des synthetisierten 9-Methylacridin mit dem isolierten Carbamazepin-Reaktionsprodukt führte zu folgende Ergebnis:

- a. äußere Eigenschaften (Farbe, Kristallform): gleich
- b. Schmelzbereich: Syntheseprodukt: 110-116°C
aus Carbamazepin: 112-118°C
- c. Schmelzbereich des Pikrates:
 1. Ausgangssubstanz Carbamazepin: 211-213°C
 2. Ausgangssubstanz 2-Aminoacetophenon: 211-214°C
 3. lt. Literaturangabe (JENSEN): 213-214°C
 4. lt. Literaturangabe (SCHINDLER): 218-220°C

d. Elementaranalyse: Syntheseprodukt aus Carbamazepin
C ber. 87,05%; gef. 87,16%; gef. 86,72%;
H ber. 5,70%; gef. 5,66%; gef. 5,76%;
N ber. 7,25%; gef. 6,95%; gef. 7,19%;

e. Spektren: Übereinstimmung von Lage und Intensität
der Signale

f. DC: Übereinstimmung der hRf-Werte.

3. Analytik möglicher Harnausscheidungsprodukte des Carbamazepin

Bei der Untersuchung der Harnextrakte war zunächst zu prüfen, ob sich unverändertes Carbamazepin nachweisen läßt. Weiter konnte mit der Ausscheidung von Iminostilben gerechnet werden, bei dem es sich um den Grundkörper des Carbamazepin handelt, der nicht mehr die Carbonamidgruppe in 5-Stellung enthält.

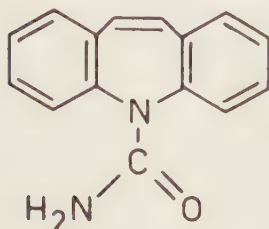
Da Dibenzazepine beim Erhitzen mit Säure eine Ringverengung erfahren und Acridinderivate entstehen können (55), andererseits in Extrakten aus biologischem Material eine für das 9-Methylacridin typische UV-Absorption gemessen wurde, war anzunehmen, daß diese Verbindung auch als Metabolit im Organismus gebildet wird.

Als weitere Modellsubstanzen wurden folgende Oxidations- und Abbauprodukte des 9-Methylacridin untersucht:

Acridin-9-carbaldehyd, Acridin und Acridon.

1. Beschreibung der untersuchten Substanzen

a. Carbamazepin



Beschreibung, UV- und IR-Spektren auf Seite 5,13,17.

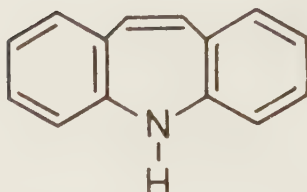
Massenspektrum: m/e: 43 82 82,5 83,5 95,5 96,5
 (Abb.24 I(%): 7 5 5 9 12 9
 S. 48)

m/e: 164 165 166 167 190 191
 I(%): 5 17 6 7 10 20

m/e: 192 193 194 236
 I(%): 36 100 18 21

Der Molpeak erscheint bei m/e 236 mit relativ geringer Intensität. Es wird zunächst HOCN abgespalten (M-43, metastabiler Peak bei m/e 158). Dann wird wahrscheinlich H und HCN eliminiert (Peaks bei m/e 192 und 165, metastabiler Peak bei m/e 142). Durch Abspaltung von Acetylen könnte ein Peak bei m/e 139 erklärt werden.

b. Iminostilben (5H-Dibenzo [b,f] azepin)



Summenformel: $C_{14}H_{11}N$

Molekulargewicht: 193,25

Aussehen: orangegelbe Kristalle

Schmelzbereich: 204 - 206°C

Löslichkeit: löslich in Äther

schwer löslich in Alkohol

UV-Spektrum:	Lösungsmittel	Maximum λ [nm]
	CH ₃ OH	257
	0,1n NaOH	257
	0,1n HCl	257

Abb.17: UV-Spektrum von Iminostilben

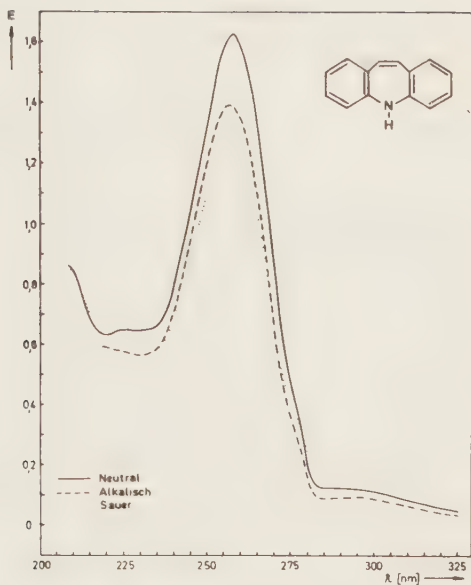
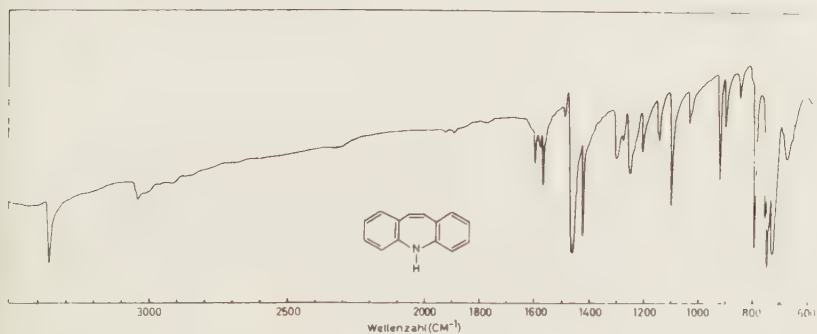


Abb.18: IR-Spektrum von Iminostilben in KBr



Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

730, 750: CH - out of plane - Deformation

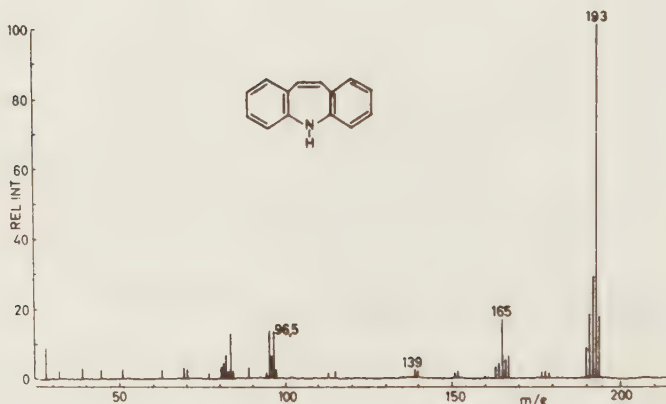
1570, 1585, 1605: CC - Valenz - Aromat

3050: CH - Valenz - Aromat

3360: NH - Valenz

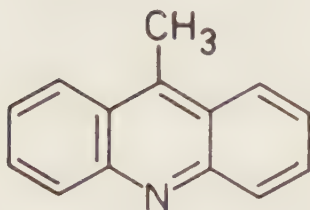
Massenspektrum:m/e:	82	82,5	83,5	95,5	96	96,5	165
I(%):	6	6	13	16	12	15	15
m/e:	166	167	190	191	192	193	194
I(%):	5	6	8	18	29	100	17

Abb.19: Massenspektrum des Iminostilben



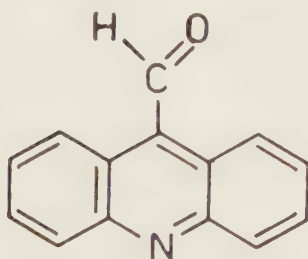
Das Molekilion erscheint bei m/e 193. Die Fragmentierung beginnt mit der Abspaltung von H und HCN (Peaks bei m/e 192 und 165, metastabiler Peak bei m/e 142). Für die weitere Eliminierung von Acetylen (165-26 = 139) spricht ein metastabiler Peak bei m/e 117.

c. 9-Methylacridin



Beschreibung und Spektren auf Seite 24-30

d. Acridin-9-carbaldehyd



Summenformel: C₁₄H₉NO

Molekulargewicht: 207,23

Aussehen: gelbe Kristallnadeln

Schmelzbereich: 143 - 146°C

Löslichkeit: wenig löslich in Alkohol und Äther,
 löslich in Chloroform,
 fast unlöslich in Wasser.

UV-Spektrum:	Lösungsmittel	Maximum λ [nm]
(Abb. 38, S. 59)	CH ₃ OH	252, 340, 356
	0,1n NaOH	252, 340, 356
	0,1n HCl	258, 338, 355

IR-Spektrum in KBr: (Abb. 40, S. 60)

Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

740: CH - out of plane - Deformation

1507, 1530, 1615: CC - Valenz - Aromat

1689: CO - Valenz - aromat. Aldehyd

2860, 2930: CH - Valenz

Massenspektrum:	m/e:	28	35	39	41	43	44	47	48	50
(Abb. 42, S. 61)	I(%):	26	10	20	11	10	26	20	11	19

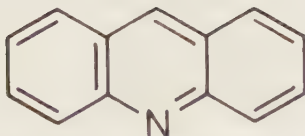
m/e:	51	55	62	63	74	75	76	77	87
I(%):	17	10	11	18	20	12	15	13	11

m/e:	98	99	150	151	152	153	177	178
I(%):	10	10	28	41	37	12	23	57

m/e:	179	180	207	208
I(%):	100	15	46	6

Das Molekülion erscheint bei m/e 207. Ein intensiver Peak bei m/e 179 (M-28) und ein metastabiler Peak bei m/e 155 beweisen die Abspaltung von CO. Weiter wird wahrscheinlich H und HCN eliminiert (Peaks bei m/e 178 und 151, metastabiler Peak bei m/e 128).

e. Acridin



Summenformel: $C_{13}H_9N$

Molekulargewicht: 179,22

Aussehen: hellgelbe Kristalle

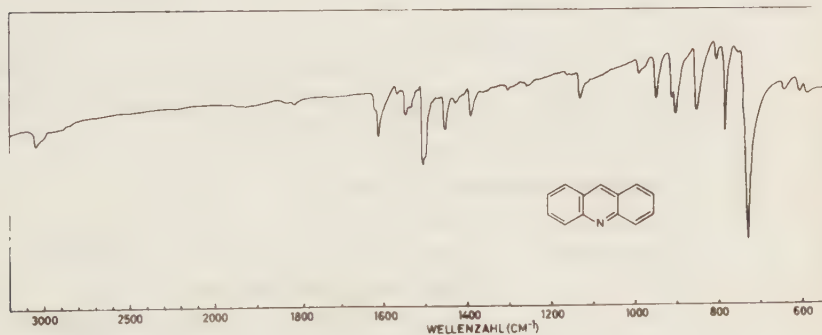
Schmelzbereich: 110-111°C

Löslichkeit: leicht löslich in Alkohol und Chloroform
löslich in Äther,
fast unlöslich in Wasser

UV-Spektrum:	Lösungsmittel	Maximum λ [nm]
(Abb. 32, S. 54)	CH_3OH	249, 336, 344, 353
	o,1n NaOH	249, 336, 344, 353
	o,1n HCl	256, 334, 350

2o:

Spektrum
Acridin
KBr



Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

730: CH - out of plane - Deformation

1510, 1535, 1550, 1570, 1615: CC - Valenz und CN -Valenz -Aromat

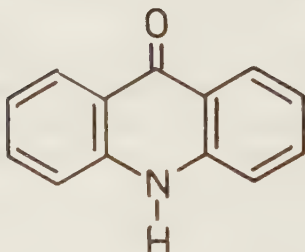
3025: CH - Valenz - Aromat

Massenspektrum: m/e: 63 75 76 89 89,5 151 152
(Abb.34, I(%): 5 5 6 14 9 9 8
S. 56)

m/e: 177 178 179 180
I(%): 7 24 100 16

Das Molekülion erscheint bei m/e 179. Auf eine Abspaltung von H und HCN deuten Peaks bei m/e 178 und 151 und ein metastabiler Peak bei m/e 128.

f. Acridon



Summenformel: $C_{13}H_9NO$

Molekulargewicht: 195,22

Aussehen: gelbgrüne Kristalle

Schmelzbereich: 354°C

Löslichkeit: fast unlöslich in Alkohol, Äther,
Chloroform und Wasser,
leicht löslich in Dimethylsulfoxid

UV-Spektrum:	Lösungsmittel	Maximum λ [nm]
(Abb.26, S. 50)	CH ₃ OH	213, 253, 376, 394
	0,1n NaOH	254, 340, 380, 396, 432
	0,1n HCl	213, 253, 376, 394

IR-Spektrum in KBr: (Abb.28, S.51)

Zuordnung einiger Banden, Absorption in cm^{-1} :

745: CH - out of plane - Deformation

1515-1565, 1590: CC - Valenz - Aromat

1630: CO - Valenz - Ringketon

11 Banden zwischen 2800 und 3300: CH - und NH - Valenz

Massenspektrum: m/e: 69,5 70 83,5 97,5 139 140

(Abb.30,
S. 52) I(%): 10 6 19 6 9 8

m/e: 166 167 194 195 196

I(%): 12 22 5 100 17

Das Molekülion erscheint bei m/e 195. Durch Abspaltung von CO sind ein Peak bei m/e 167 (M-28) und ein metastabiler Peak bei m/e 143 zu erklären. Weiter wird durch Peaks bei m/e 140 und 139 und einen metastabilen Peak bei m/e 117 die Eliminierung von HCN und H angezeigt (57).

2. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Modellsubstanzen erfolgte auf DC-Fertigplatten Merck Kieselgel GF₂₅₄, 0,25 mm Schichtdicke bei Kammersättigung in zwei Fließmittelsystemen:

1. Chloroform/Äther 9:1 (FM 1)
2. Chloroform/Aceton/Ameisensäure 5:4:1 (FM 2)

Tab.4: hRf-Werte und Farbe der Modellsubstanzen auf der DC-Platte nach Entwicklung in den Fließmitteln FM 1 und FM 2

Modell- substanzen	hRf-Werte		Detektion		
	in		im Tages- licht	im UV-Licht	
	FM1	FM2		254 nm	360 nm
Carbamazepin	11	60	-	Fluor.lösch.	-
Iminostilben	58	75	gelb	Fluor.lösch.	graublau
9-Methylacridin	29	34	gelb	gelbgrün	hellblau
Acridin-9-carbaldehyd	43	53	gelb	Fluor.lösch.	olivgrün
Acridin	35	34	gelb	gelbgrün	hellblau
Acridon	23	61	-	blau	blau

D. Metabolismus des Carbamazepin

1. Untersuchungsmaterial

Im Rahmen der therapeutischen Anwendung von Carbamazepin beim Menschen kommt es offenbar relativ selten vor, daß ein Patient diese Verbindung als einziges Medikament einnimmt. Es war deshalb zunächst schwierig, einen geeigneten Probanden zu finden. Erste Untersuchungen wurden durchgeführt an Harn einer Patientin, die in suicidalen Absicht 20 g Carbamazepin eingenommen hatte. Später stand der Harn von zwei weiteren Patientinnen zur Verfügung, die regelmäßig Tegretal® einnahmen und zwar 1200 mg bzw. 2400 mg/die. Der Harn wurde über mehrere Tage gesammelt und bis zur Aufarbeitung bei 2 - 6°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2. Aufarbeitung

Jeweils 100 ml Harn wurden mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung auf pH 9 eingestellt und mit 200 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde in wenig Chloroform gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

3. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte

Chromatographiert wurde auf Merck Fertigplatten Kieselgel GF₂₅₄, 0,25 mm dick bei Kammersättigung. Unter den getesteten Fließmittelsystemen erwiesen sich zwei als besonders geeignet:

- | | |
|-----------------------------------|----------------|
| 1. Chloroform/Äther | 9:1 (FM 1) |
| 2. Chloroform/Aceton/Ameisensäure | 5:4:1 (FM 2) |

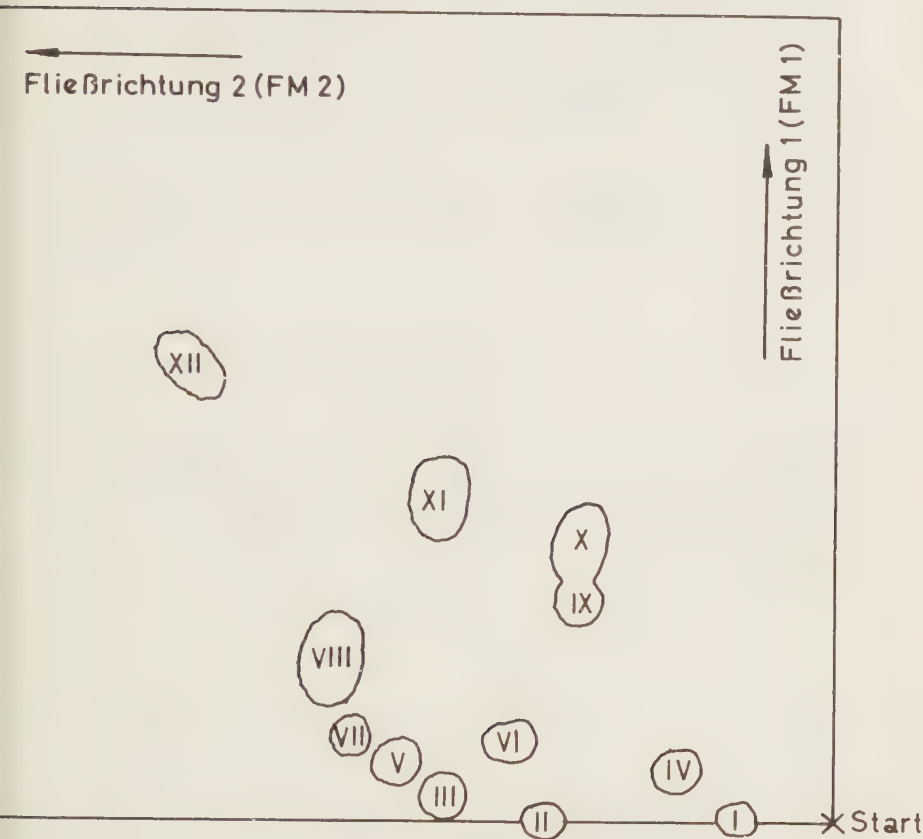
Eine zufriedenstellende Auftrennung der Ausscheidungsprodukte wurde jedoch erst durch Kombination der beiden Fließmittelsysteme in Form der zweidimensionalen DC erreicht.

Durch Detektion im UV-Licht bei 254 nm und 360 nm ließen sich mindestens zwölf Substanzflecken unterscheiden.

Tab.5: hRf-Werte und Farbe der aufgetrennten Verbindungen auf der DC-Platte nach zweidimensionaler Trennung

Subst. Nr.	hRf-Werte		Detektion		
	in		a. im Tagesl.	b. im UV-Licht	
	FM1	FM2		254 nm	360 nm
I	0	12	gelb	grün	grün
II	0	36	-	blau	blau
III	3	48	-	blaugrün	blaugrün
IV	5	19	-	grün	grün
V	6	54	-	Fluor-Lösch.	-
VI	8	41	-	Fluor-Lösch.	-
VII	10	59	-	Fluor-Lösch.	-
VIII	22	61	-	blau	blau
IX	30	33	gelb	gelbgrün	hellblau
X	35	33	gelb	gelbgrün	hellblau
XI	42	52	gelb	Fluor-Lösch.	olivgrün
XII	57	74	gelb	Fluor-Lösch.	graublau

Abb.21: Verteilung der Harnausscheidungsprodukte auf der DC-Platte nach zweidimensionaler Entwicklung



Fließmittel 1 (FM 1): Chloroform/Äther

9:1

Fließmittel 2 (FM 2): Chloroform/Aceton/Ameisensäure 5:4:1

4. Isolierung von Harnausscheidungsprodukten

Dazu wurden weitere Harnextrakte bandförmig auf präparative DC-Platten aufgetragen und in dem Fließmittel Chloroform/Äther 9:1 entwickelt. Die Zonen mit den Substanzen Nr.VII bis Nr.XII wurden abgeschabt und mit Methanol eluiert. Nach dem Einengen der Lösungen wurden sie erneut bandförmig auf verschiedene präparative DC-Platten aufgetragen und zur Reinigung in dem Fließmittel Chloroform/Methanol 8:2 entwickelt. Die Eluate von mehreren Platten wurden gesammelt, zweimal filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

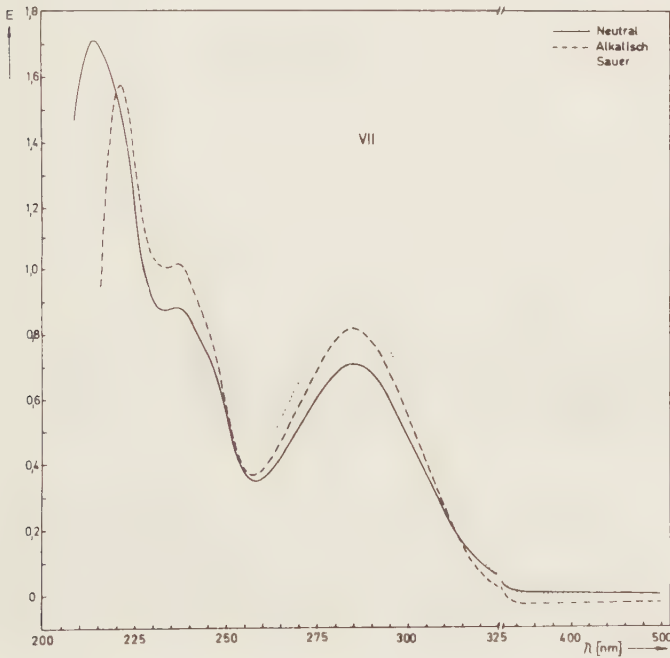
5. Identifizierung der Substanzen Nr.VII bis Nr.XII und Vergleich mit den Modellsubstanzen

Zur Charakterisierung der isolierten und gereinigten Substanzen wurden UV-, IR- und Massenspektren aufgenommen und mit den entsprechenden Spektren der Modellsubstanzen verglichen.

a. Substanz Nr.VII

VII verhält sich dünnschichtchromatographisch wie das Ausgangsprodukt Carbamazepin (Tab.4, S.41 und Tab.5, S.43). Das UV-Spektrum der aus Harn isolierten Substanz zeigt völlige Übereinstimmung mit dem des Carbamazepin (Abb.1, S.13).

Abb.22: UV-Spektrum von VII



Ein IR-Spektrum konnte wegen der zu geringen isolierten Substanzmenge nicht aufgenommen werden.

Das Massenspektrum von VII gleicht dem des Carbamazepin.
Die Fragmentierungsschritte $236 - 43$ und $192 - 27$ werden
durch metastabile Peaks bei m/e 158 und 142 bewiesen.

Abb.23: Massenspektrum von VII

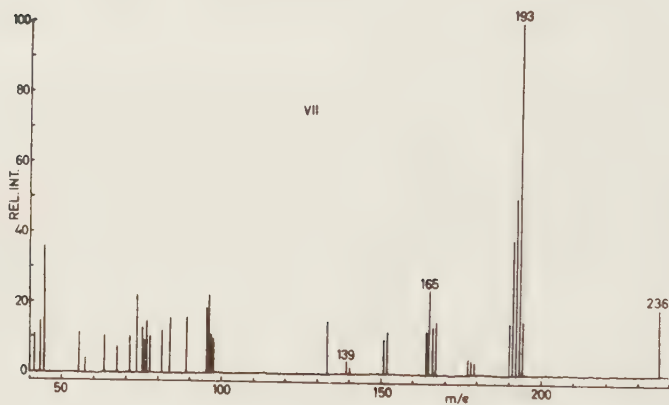
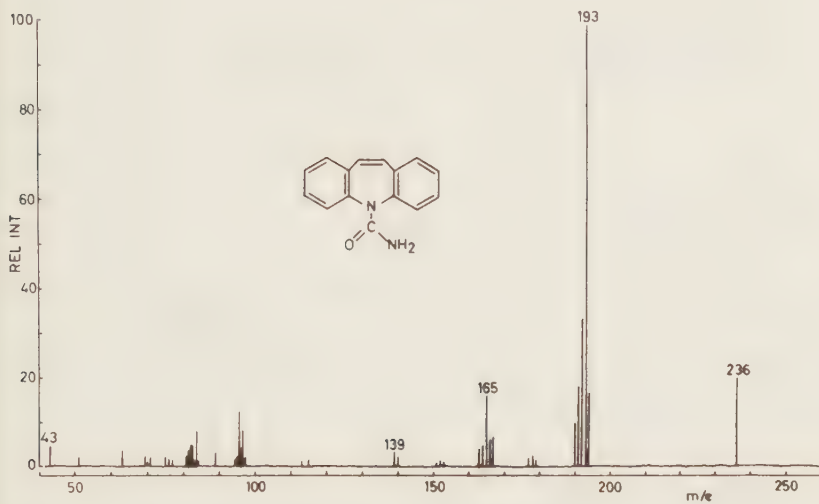


Abb.24: Massenspektrum von Carbamazepin



Die Übereinstimmung der untersuchten chemischen und physikalischen Eigenschaften von VII und Carbamazepin-Reinsubstanz zeigt die Identität dieser beiden Verbindungen.

b. Substanz Nr.VIII

Auf der DC-Platte gleichen die Eigenschaften von VIII denen der Vergleichssubstanz Acridon hinsichtlich der R_f -Werte in verschiedenen Fließmitteln und des Verhaltens im lang- und kurzwelligen UV-Licht (Tab.4, S.41 und Tab.5, S.43).

Die Absorptionskurven von VIII und Acridon im UV-Licht in verschiedenen Lösungsmitteln stimmen überein.

Abb.25:UV-Spektrum von VIII

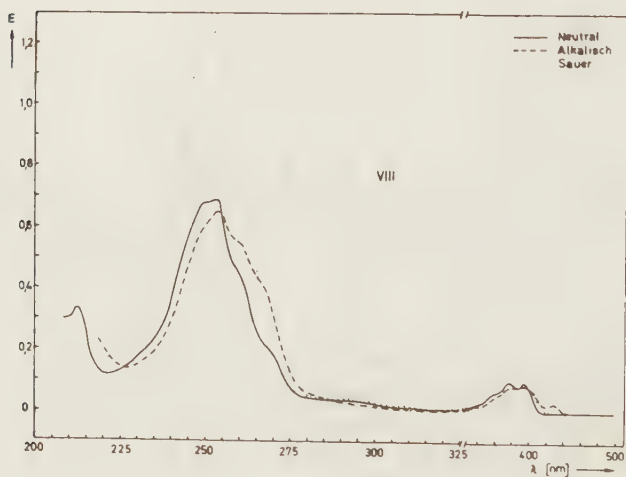
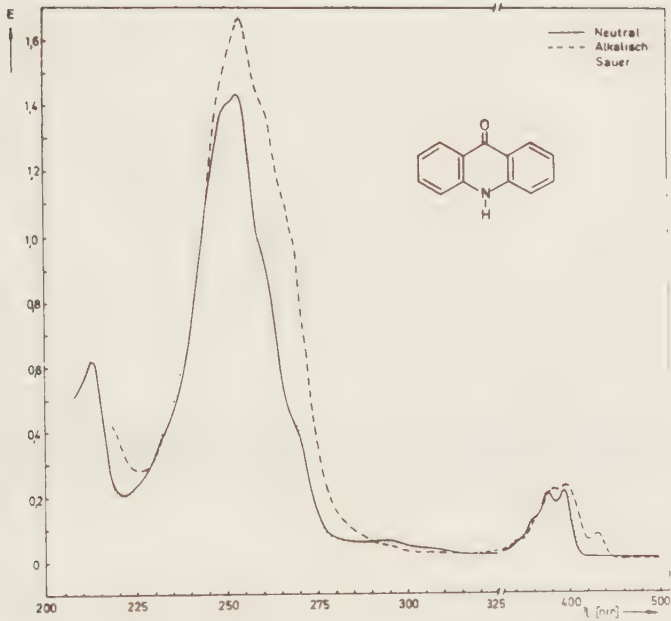


Abb.26: UV-Spektrum von Acridon



Die IR-Spektren von VIII und Acridon zeigen die gleichen Absorptionsbanden.

Abb.27: IR-Spektrum von VIII in KBr

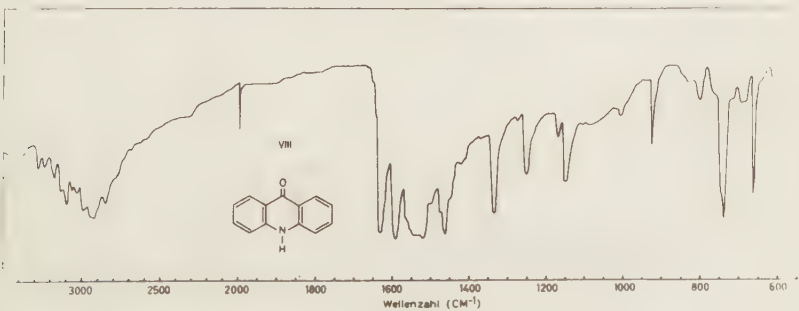
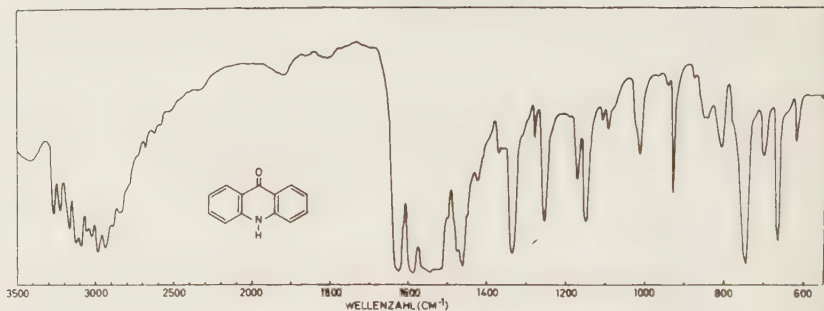


Abb.28: IR-Spektrum von Acridon in KBr



Das Massenspektrum der aus Harn isolierten Substanz VIII und das des Acridon stimmen überein. Auch beim Spektrum von VIII treten metastabile Peaks bei m/e 143 und 117 auf.

Abb.29:Massenspektrum von VIII

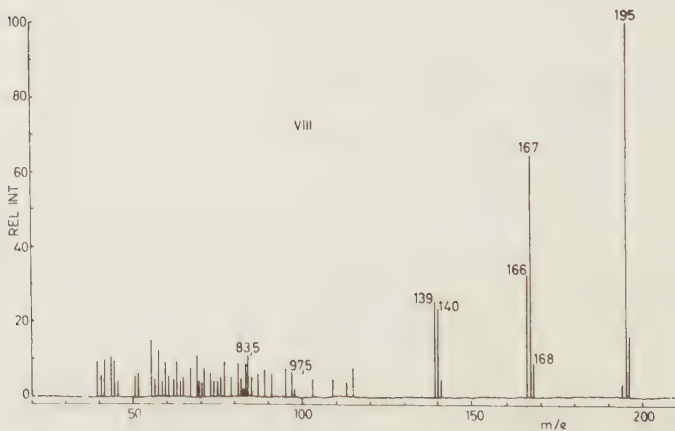
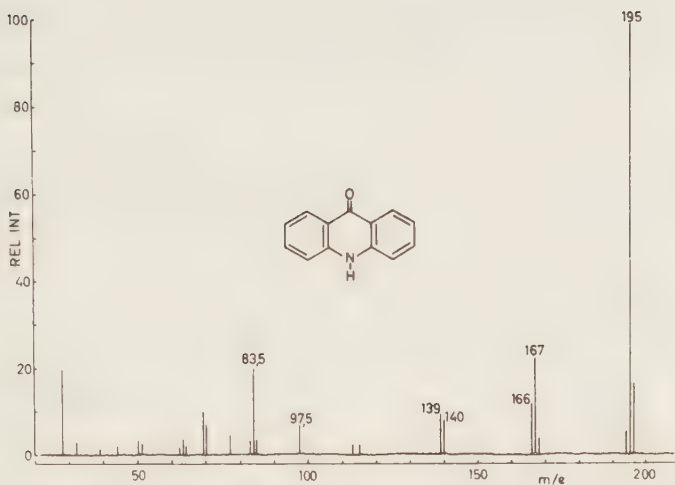


Abb.30: Massenspektrum von Acridon



Eine Hochauflösung des Massenspektrums von VIII und Bestimmung des Molekulargewichts ergab die Summenformel $C_{13}H_9NO$.

MG ber. 195, o384, gef. 195, o674

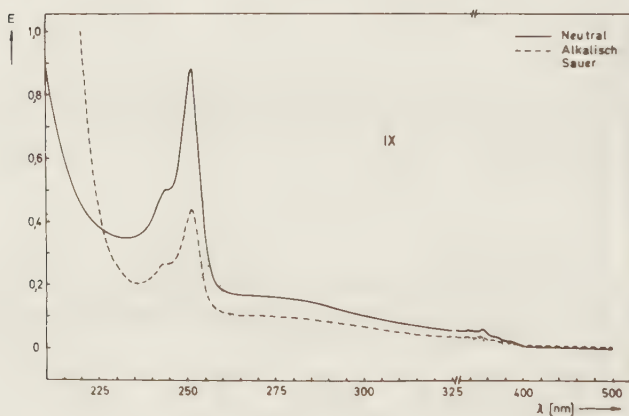
Damit kann gesagt werden, daß VIII mit Acridon identisch ist.

c. Substanz Nr.IX

Auf der DC-Platte verhält sich IX wie X und die Vergleichssubstanzen Acridin und 9-Methylacridin. Nur in dem Fließmittel Chloroform/Äther 9:1 unterscheidet es sich von X und Acridin durch seine geringere Wanderungsgeschwindigkeit und besitzt den gleichen R_F -Wert wie das 9-Methylacridin (Tab.4, S.41 und Tab.5, S.43).

Auch die UV-Absorption von IX in verschiedenen Lösungsmitteln weicht von der des Acridin etwas ab, ist aber identisch mit der des 9-Methylacridin (Abb.13, S.26).

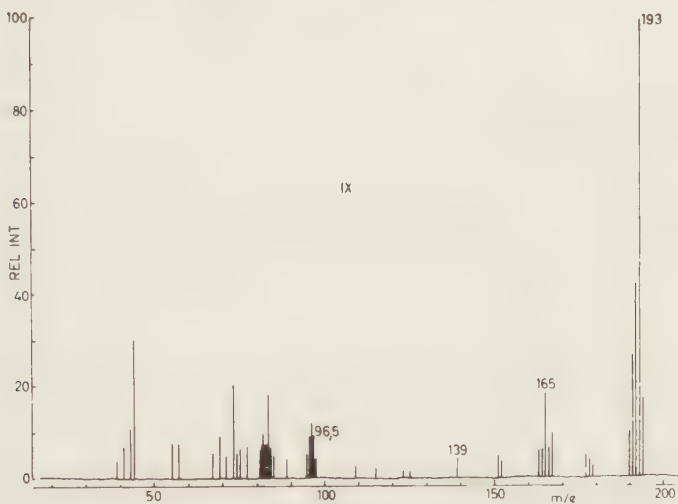
Abb.31: UV-Spektrum von IX



Ein IR-Spektrum konnte wegen der zu geringen isolierten Substanzmenge nicht aufgenommen werden.

Das Massenspektrum von IX ist identisch mit dem des 9-Methylacridin (Abb.16, S.28) (M^+ bei m/e 193, Abspaltung von H und HCN, Peaks bei m/e 192 und 165) und auch mit dem des Iminostilben. Vom Iminostilben unterscheidet sich IX aber eindeutig durch sein DC-Verhalten und durch seine UV-Absorption.

Abb.32: Massenspektrum von IX



Obwohl IX in einzelnen chemischen und physikalischen Daten anderen Verbindungen gleicht, stimmt es in allen untersuchten Eigenschaften nur mit dem 9-Methylacridin überein.

d. Substanz Nr.X

Aufgrund der großen Ähnlichkeit von IX und X im dünnschichtchromatographischen Verhalten gelang es nur durch Mehrfachentwicklung im Fließmittel Chloroform/Äther 9:1 diese beiden Substanzen zu trennen. X besitzt hier den gleichen R_f -Wert wie die Vergleichssubstanz Acridin (Tab.4, S.41 und Tab.5, S.43).

Das UV-Spektrum von X zeigt den gleichen Kurvenverlauf und die gleichen Maxima wie das Acridin.

Abb.33: UV-Spektrum von X

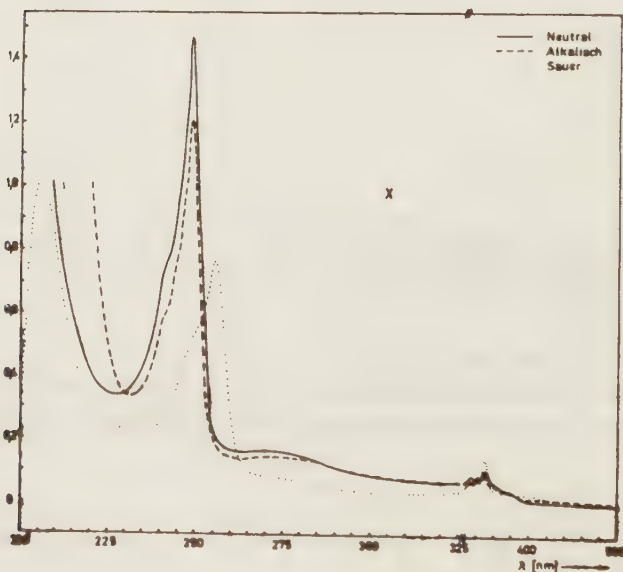
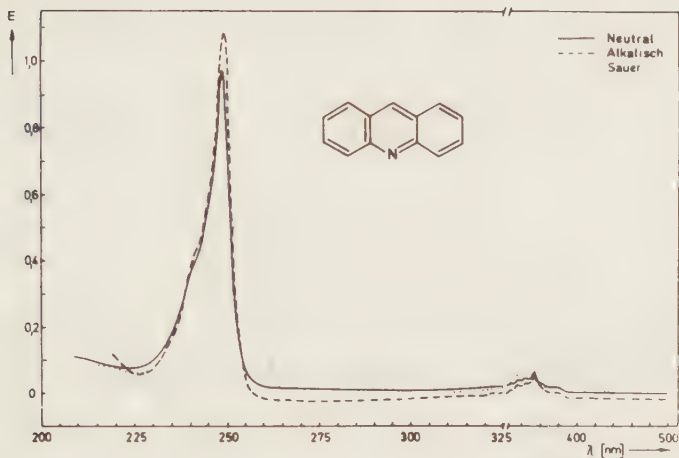


Abb.34: UV-Spektrum von Acridin



Ein IR-Spektrum konnte wegen der zu geringen isolierten Substanzmenge nicht aufgenommen werden.

Das Massenspektrum von X ist identisch mit dem des Acridin (M^+ bei m/e 179, Abspaltung von H und HCN, erhärtet durch einen metastabilen Peak bei m/e 128) und unterscheidet sich eindeutig vom Spektrum des 9-Methylacridin.

Abb.35: Massenspektrum von X

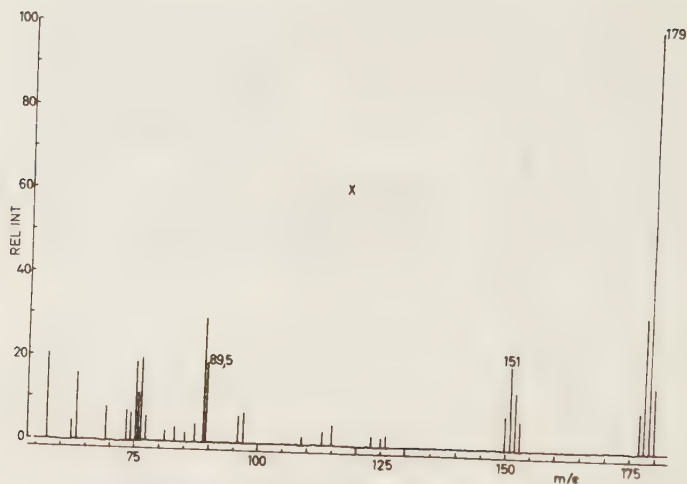
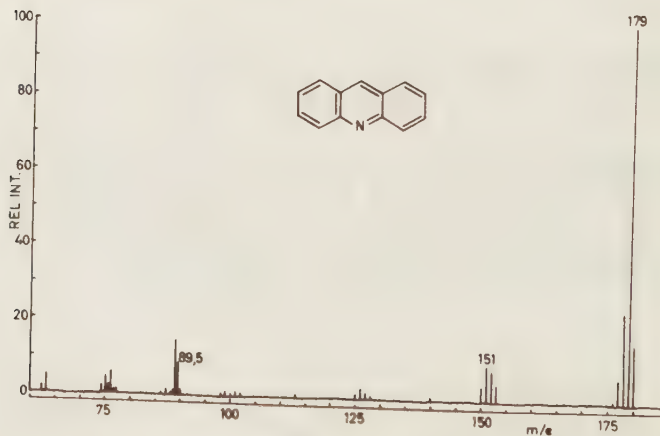


Abb.36: Massenspektrum von Acridin



Trotz der hinsichtlich DC-Verhalten und UV-Absorption sehr ähnlichen Eigenschaften von X, Acridin und 9-Methylacridin kann aufgrund des Massenspektrums gesagt werden, daß es sich bei der aus Harn isolierten Substanz Nr.X eindeutig um Acridin handelt.

e. Substanz Nr.XI

XI verhält sich dünnschichtchromatographisch wie die Vergleichssubstanz Acridin-9-carbaldehyd. Die R_{F} -Werte in verschiedenen Fließmitteln und die Farbe im lang- und kurzwelligen UV-Licht stimmen überein (Tab.4, S.41 und Tab.5, S.43).

Auch die UV-Absorption in verschiedenen Lösungsmitteln ist gleich der des Acridin-9-carbaldehyd.

Abb.37: UV-Spektrum von XI

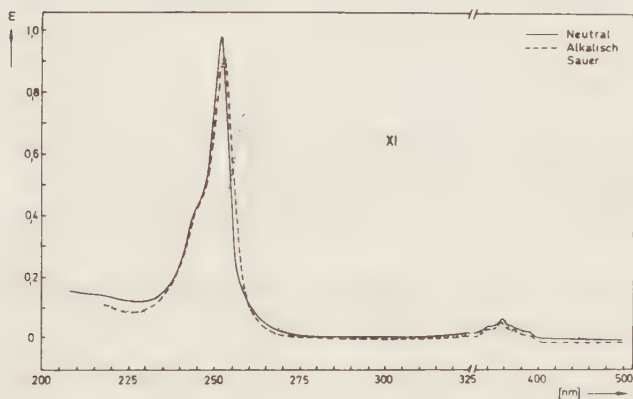
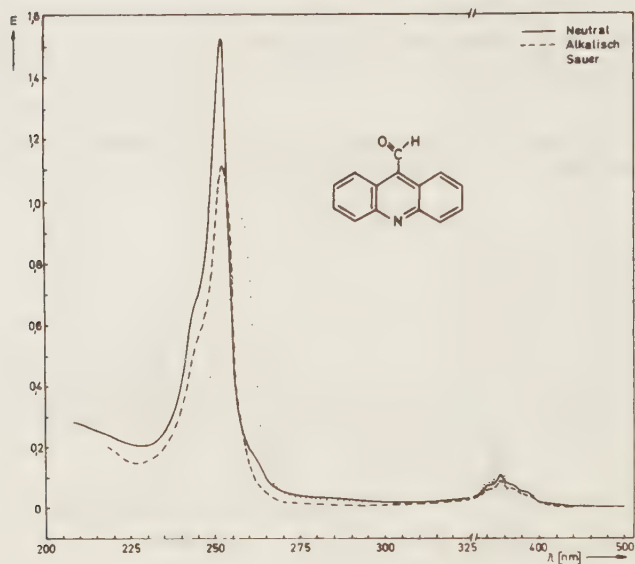


Abb.38: UV-Spektrum von Acridin-9-carbaldehyd



Die IR-Spektren von XI und Acridin-9-carbaldehyd weisen die gleichen Absorptionsbanden auf.

Abb.39: IR-Spektrum von XI in KBr

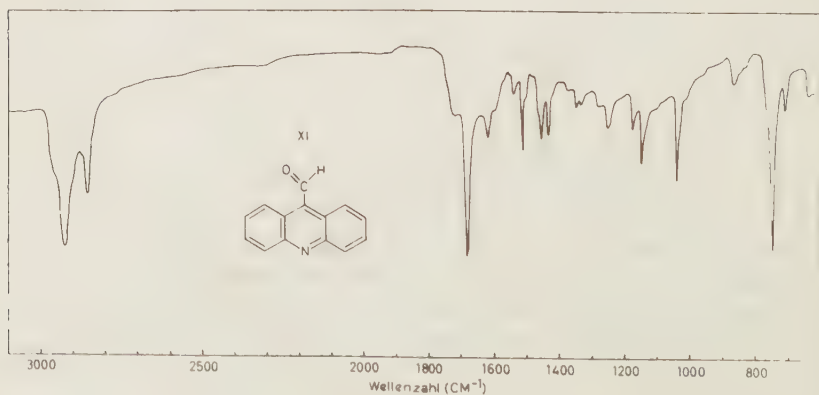
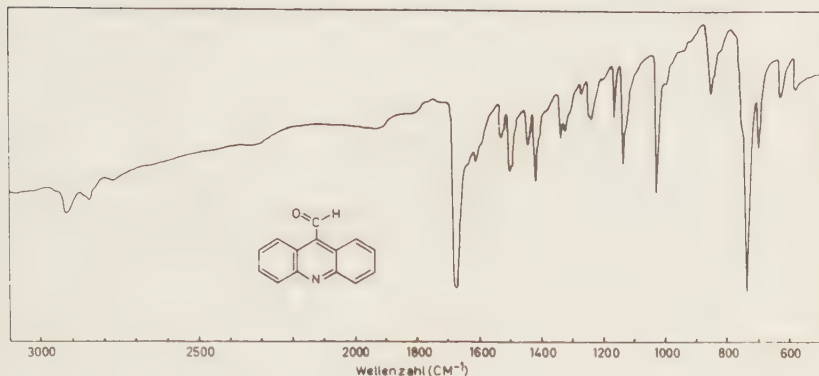


Abb.40: IR-Spektrum von Acridin-9-carbaldehyd in KBr



Die Massenspektren der aus Harn isolierten Substanz XI und der Vergleichssubstanz Acridin-9-carbaldehyd zeigen den gleichen Molpeak und das gleiche Fragmentierungsschema.

Abb.41: Massenspektrum von XI

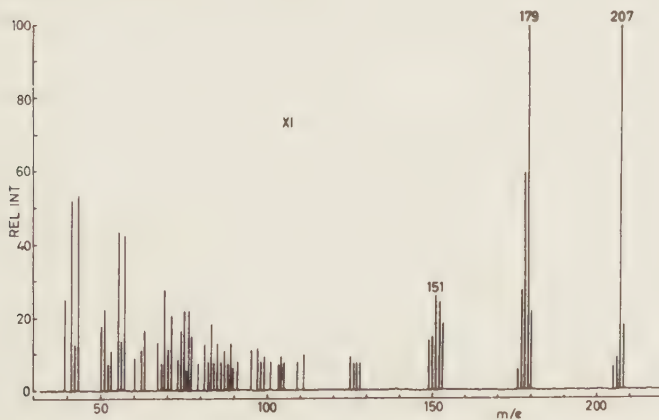
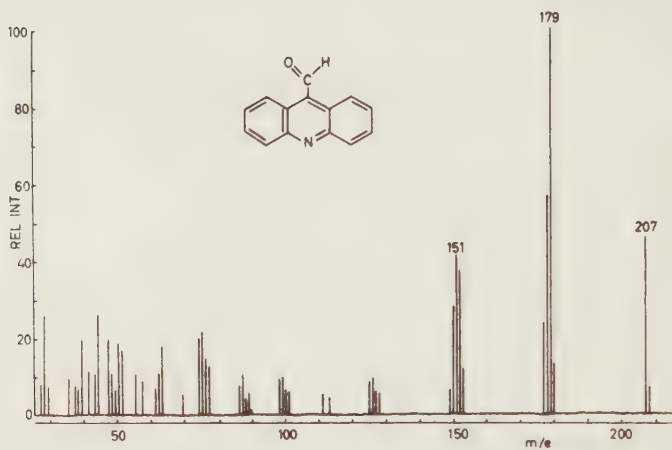


Abb.42: Massenspektrum von Acridin-9-carbaldehyd



Die Übereinstimmung von XI und Acridin-9-carbaldehyd in den beschriebenen Eigenschaften beweist ihre Identität.

f. Substanz Nr.XII

Substanz Nr.XII ließ sich in den Harnextrakten nur in relativ geringen Mengen nachweisen. Sie verhielt sich dünn-schichtchromatographisch wie die Vergleichssubstanz Iminostilben, konnte aber durch präparative DC nicht gereinigt werden, weil sie - wie auch die Vergleichssubstanz - eine für dieses Verfahren nicht ausreichende Stabilität besaß.

Die Identität von XII mit Iminostilben ließ sich so nicht mit Sicherheit beweisen, wenn auch sein Auftreten als Carbamazepin-Metabolit wahrscheinlich ist.

III. ERGEBNISSE

- A. Es werden analytische Daten der sechs therapeutisch angewandten Dibenzazepine angegeben. Eine dünnschichtchromatographische Trennung in fünf verschiedenen Fließmittelsystemen und die Reaktion sowie die Nachweisempfindlichkeit der Substanzen mit drei Sprühreagenzien werden beschrieben.
- B. Die von BEYER und KLINGE (12) für ihre quantitative Carbamazepinbestimmung herangezogene Bezugssubstanz wurde durch Aufnahme von Spektren als 9-Methylacridin identifiziert und durch Synthese bewiesen.
- C. Es wurden im Harnextrakt von Patienten, die mit Carbamazepin behandelt wurden, dünnschichtchromatographisch zwölf Ausscheidungsprodukte abgegrenzt. Fünf dieser Substanzen wurden durch Spektren und Vergleich mit Referenzsubstanzen identifiziert. Es handelt sich dabei um:
1. unverändertes Carbamazepin
 2. 9-Methylacridin
 3. Acridin-9-carbaldehyd
 4. Acridin
 5. Acridon
- Iminostilben konnte als Metabolit nur in geringen Mengen dünnschichtchromatographisch nachgewiesen, aber nicht durch Spektren bewiesen werden.

Bei Untersuchungen von Harnextrakten mit der Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination MAT 111 der Fa. Varian wurde einmal das Massenspektrum von Coffein erhalten. Die Anwesenheit von Coffein wurde auch dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. Es handelt sich dabei um Substanz Nr. VI (Abb. 21, S. 44).

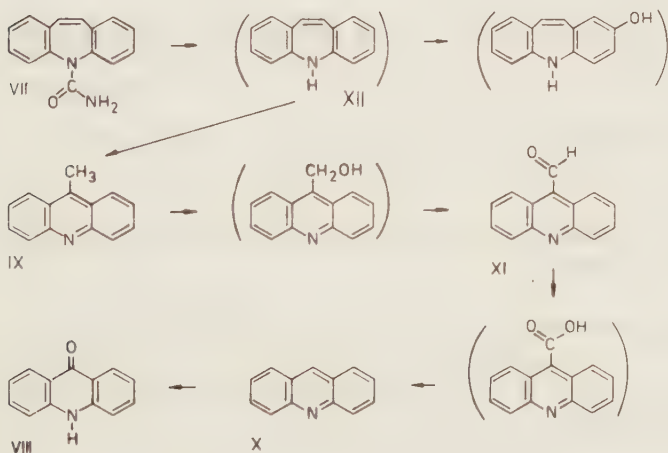
Weiter wurden die Massenspektren von zwei Substanzen mit den Molekulargewichten 223 und 209 aufgenommen. Es könnte sich dabei einmal um die Acridin-9-carbonsäure handeln (MG 223). Für die Substanz mit dem Molekulargewicht 209

kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

1. 2-Hydroxyiminostilben
2. 9-Hydroxymethylacridin

Die betreffenden Spektren waren wegen unzureichender gaschromatographischer Vortrennung zu unsauber, um weitere Informationen daraus gewinnen zu können.

Bei der Metabolisierung des Carbamazepin im Menschen scheint nach unseren Untersuchungen zuerst die Carbonamidgruppe abgespalten zu werden. Das resultierende Iminostilben lagert sich unter Ringverengung in das 9-Methylacridin um, das dann oxydiert wird: 9-Hydroxymethylacridin - Acridin-9-carbaldehyd - Acridin-9-carbonsäure. Aus der Carbonsäure könnte durch Eliminierung von CO_2 Acridin entstehen, das weiter zu Acridon oxydiert werden kann.



IV. EXPERIMENTELLE ANGABEN

Dünnschichtchromatographie

1. Plattengröße 20 x 20 cm, Adsorbens: Kieselgel GF₂₅₄ Merck. Schichtdicke: 0,25 mm. Beschichtung mit dem Desaga Streichgerät.
2. DC-Fertigplatten Kieselgel GF₂₅₄ Merck, 0,25 mm Schichtdicke.
3. Präparative Platten: Adsorbens: Kieselgel PF₂₅₄ Merck, Schichtdicke: 1 mm, Beschichtung mit dem Desaga-Streichgerät.

Die selbstgestrichenen Platten waren nach 24-stündigem Trocknen an der Luft gebrauchsfertig.

Es wurde bei Kammersättigung gearbeitet; die Fließhöhe betrug 15 cm.

Die angegebenen R_f -Werte sind jeweils Mittel aus mindestens drei Versuchen.

Die Zusammensetzung der Fließmittel ist in Volumenteilen angegeben.

Die Schmelzpunkte wurden im Lindströmblock ermittelt; es handelt sich um unkorrigierte Werte.

Die Elementaranalysen wurden im Pharmazeutischen Institut der FU durchgeführt.

UV-Spektren: selbstregistrierendes Spektralphotometer
Zeiss DMR 21

IR-Spektren: Perkin-Elmer-Spektralphotometer 237 und 421

NMR-Spektrum: Varian-Gerät A-60-A; Tetramethylsilan
als innerer Standard.

Massenspektren: Varian-CH-7-Gerät

A.E.I.-MS9-Gerät

Varian MAT 111 GC/MS - Kombination

Darstellung der Substanzen

1. 9-Methylacridin

Die Synthese erfolgte nach JENSEN und RETHWISH (56).

6 g o-Aminoacetophenon und 8 g Brombenzol wurden unter Zusatz von 0,4 g Kupferpulver und 10 g wasserfreiem Natriumcarbonat in 60 ml Nitrobenzol 3 Stunden bei 220°C am Rückflußkühler erhitzt. Das Nitrobenzol und das überschüssige Brombenzol wurden durch Wasserdampfdestillation entfernt. Der Rückstand wurde mit Äther extrahiert, der Äther mit Natriumsulfat getrocknet und abgedampft.

Das Kondensationsprodukt 2-Acetyldiphenylamin wurde in 15 ml Eisessig gelöst und nach Hinzufügen von 3 ml konz. Schwefelsäure 5 min im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde die Lösung in Eiswasser gegossen und filtriert.

Das Filtrat wurde mit Ammoniak alkalisiert, der Niederschlag abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Zur Reinigung wurde der Niederschlag in Methanol gelöst und durch Hinzufügen von Wasser das 9-Methylacridin ausgefällt.

Elementaranalyse und Schmelzpunkt S. 29, 30.

Die Identität wurde durch Molekülspektren bewiesen.

2. Acridin-9-carbaldehyd

Die Synthese erfolgte nach KAUFMANN und VALLETTE (58) durch Kondensation von p-Nitrosodimethylanilin mit 9-Methylacridin und Spaltung des Kondensationsproduktes mit Salzsäure.

Dazu wurde äquimolare Mengen p-Nitroso-N,N-dimethylanilin und 9-Methylacridin zusammengeschmolzen. Es entstand ein rotbrauner Kristallkuchen, der durch Extraktion mit Alkohol von nicht in Reaktion getretenen Ausgangssubstanzen befreit wurde.

Das Kondensationsprodukt wurde durch Lösen in verdünnter Salzsäure gespalten und der entstandene Acridin-9-carbaldehyd durch Alkalisieren der Lösung mit Natriumcarbonat gefällt und abgesaugt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit Chloroform/Äther 9:1 als Lösungsmittel wurden gelbe Kristalle erhalten, die bei 143-146°C schmolzen (Literatur: 148°C). Die Identität wurde durch Aufnahme eines Massenspektrums bestätigt (Abb.42, S.61).

Die sechs untersuchten Dibenzazepine und das Iminostilben wurden freundlicherweise von der Firma GEIGY AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

Acridin und Acridon wurden von der Firma FLUKA AG, Buchs/Schweiz, bezogen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. KUHN, R.
Schweiz.med.Wschr. 87, 1135 (1957)
2. HERRMANN, B., R. PULVER
Arch.int.Pharmacodyn 126, 454 (1960)
3. GILLETTE, J. R., J. V. DINGELL, F. SULSER, R. KUNTZMAN,
B. B. BRODIE
Experientia 17, 417 (1961)
4. KETZ, E.
Praxis 53, 264 (1964)
5. PAKESCH, E.
Wien.med.Wschr. 113, 794 (1963)
6. BLOM, S.
Lancet 1, 839 (1962)
7. BONDUELLE, M., R. HOUDART, P. BOUGYUES,
Rev.neurol. 108, 61 (1963)
8. BICKEL, M. H., R. BROCHON, B. FRIOLET, B. HERRMANN,
A. R. STOFER
Psychopharmacologia 10, 431 (1967)
9. DRABNER, J., H. BAUER, W. SCHWERD
Arch.Toxikol. 21, 367 (1966)
10. IM OBERSTEG, J., J. BÄUMLER
Arch.Toxikol. 19, 339 (1962)
11. FARAGO, A.
Arch.Toxikol. 21, 30 (1965)
12. BEYER, K.-H., D. KLINGE
Arzneimittel-Forsch. 19, 1759 (1969)
13. HERRMANN, B.
Arzneimittel-Forsch. 14, 219 (1964)
14. HERRMANN, B., W. SCHINDLER, R. PULVER
Med.exp. 1, 381 (1959)
15. SCHEIFFARTH, F., F. WEIST, L. ZICHA
Z.klin.Chem. 4, 68 (1966)
16. WEIST, F., L. ZICHA
Arzneimittel-Forsch. 17, 874 (1967)

17. FÜHR, J.
Arzneimittel-Forsch. 14, 74 (1964)
18. SCHNEIDER, G.
J.Chromatog. 31, 612 (1967)
19. KLINGE, D., K.-H. BEYER
Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 780 (1968)
20. VIALA, A., F. GOUZEO, C. GOLA
J.Chromatog. 45, 94 (1969)
21. WEIST, F., E. SCHMID
Med. Welt 20, 369 (1969)
22. LAUFFER, S., E. SCHMID, F. WEIST
Arzneimittel-Forsch. 19, 1965 (1969)
23. BICKEL, M. H., H. J. WEDER
Arch. int. Pharmacodyn. 173, 433 (1968)
24. THEOBALD, W., H. A. KUNZ
Arzneimittel-Forsch. 13, 122 (1963)
25. STENGER, E. G., F. C. ROULET
Med. exp. 11, 191 (1964)
26. BRAUNHOFER, J., L. ZICHA
Med. Welt 17, (NF) 1875 (1966)
27. GEIGY Chem. Corp. US pat. 2,943,718 (1960)
28. British Pharmaceutical Codex 1968, Suppl. 1971, S. 10
29. THEOBALD, W., O. BÜCH, H. A. KUNZ, Cl. MORPURGO
Arzneimittel-Forsch. 17, 561 (1967)
30. J. R. GEIGY A.-G. Swiss. Pat. 371, 799 (1963)
in Chem. Abstr. 60, 11995c (1964)
31. CRAIG, P. N., B. M. LESTER, A. J. SAGGIOMO, C. KAISER,
Ch. L. ZIRKLE
J. Org. Chem. 26, 135 (1961)
32. HERRMANN, B., H. STIERLIN
Boll. chim. Farm. 107, 688 (1968)
33. GEIGY AG, Belg. pat. 614,616 (1962)
in Chem. Abstr. 58, 11338c (1963)
34. British Pharmaceutical Codex 1968, S. 237
35. GEIGY AG, Brit. pat. 908, 788 (1962)

36. BORGÅ, O., D.L. AZARNOFF, F. SJOQVIST
J. Pharm. Pharmacol. 20, 571 (1968)
37. DINGELL, J. V., F. SULSER, J. R. GILLETTE
J. Pharmac. exp. The. 143, 14 (1964)
38. SCHINDLER, W., F. HÄFLIGER
Helv. Chim. Acta 37, 472 (1954)
39. British Pharmaceutical Codex 1968, S. 338
40. CRAMMER, J. L., B. SCOTT, H. WOODS, B. ROLFE
Psychopharmacologia 12, 263 (1968)
41. BICKEL, M. H., H. J. WEDER
J. Pharm. Pharmacol. 21, 160 (1969)
42. BERNHARD, K., H. BEER
Helv. Physiol. Acta 20, 114 (1962)
43. SCHINDLER, W.
Helv. Chim. Acta 43, 35 (1960)
44. BICKEL, M. H., M. BAGGIOLINI
Biochem. Pharmacol. 15, 1155 (1966)
45. CRAMMER, J. L., B. SCOTT
Psychopharmacologia 8, 461 (1966)
46. J. R. GEIGY A.-G. DBP 1133729 (1962)
in Chem. Abstr. 58, 10219a (1963)
47. RHONE-POULENC, S. A., Fr. pat. M 209 (1961)
in Chem. Abstr. 58, 3442f (1963)
48. JACOB, R. M., M. MESSER
Comp. Rend 252, 2117 (1961)
49. British Pharmaceutical Codex 1968, Suppl. 1971, S. 72
50. WILLIAMS, D. H., J. FLEMING
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968
51. STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie.
Springer Verlag, Berlin-Heidel-New York, 2. Aufl. 1967
52. FENNER, H.
Z. Anal. Chem. 249, 124 (1970)
53. GRUSKA, H., K.-H. BEYER, St. KUBICKI, H. SCHNEIDER
Arch. Toxikol. 26, 149 (1970)
54. DMS UV-Atlas, Vol. III, H8/1, Verlag Butterworths und
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

- 55. SCHINDLER, W., H. BLATTNER
Helv. Chim. Acta 44, 753 (1963)
- 56. JENSEN, H., F. RETHWISH
J. Am. Chem. Soc. 50, 1144 (1928)
- 57. BOWIE, J. H., COOKS, R. G., R. H. PRAGER, H. M. THREDGOLD
Aust. J. Chem. 20, 1179 (1967)
- 58. KAUFMANN, A., L. G. VALLETTE
Chem. Ber. 45, 1736 (1912)

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und in der Landesanstalt für Lebensmittel-,Arzneimittel- und gerichtliche Chemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr.G.Schenck und Herrn Privatdozent Dr.K.-H.Beyer angefertigt.

Herrn Prof.Dr.G. S c h e n c k danke ich sehr für das mir entgegengebrachte Interesse und die wohlwollende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr.K.-H. B e y e r bin ich sehr dankbar für die Überlassung des Themas, für die Betreuung der Arbeit und für seine stete Bereitschaft, alle im Rahmen der Arbeit auftretenden Probleme zu diskutieren.

Lebenslauf

Am 16.6.1941 wurde ich als Sohn des Landwirts Hubert Bredenstein und seiner Ehefrau Elisabeth, geb.Böhne, in Schlochtern W., Kreis Melle, geboren.
Von 1948 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Wellingholzhausen und anschließend das Gymnasium Carolinum in Osnabrück, wo ich im Februar 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Meine Praktikantenzeit in der Storchen-Apotheke in Gütersloh von April 1961 bis März 1963 schloß ich mit dem Pharmazeutischen Vorexamen in Detmold ab.

Ab SS 1964 studierte ich an der TU Berlin Lebensmittelchemie. Zum WS 1965/66 erhielt ich die Zulassung zum Pharmaziestudium an der FU Berlin, das ich im Herbst 1967 mit der Pharmazeutischen Prüfung abschloß.

Meine Approbation als Apotheker erlangte ich im Dezember 1968.

Seit Juni 1968 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr.G.Schenck und Herrn Privatdozent Dr.K.-H.Beyer an der vorliegenden Dissertation.

